ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN GERINNUNGSFAKTOR VIII AUS DEM PLASMA EINES PATIENTEN MIT HEMMKÖRPERHÄMOPHILIE A

Gonschior, Bernd
Diss. Düsseldorf
1983

UNIV.
LEIDEN

Gonschior, Bernd

Isolierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Gerinnungsfaktor VIII aus dem Plasma eines Patienten mit Hemmkörperhämophlie A. - 1983. - 57 S.

Düsseldorf, Univ., Diss., 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. med. H. Trobisch

Koreferent
gez.: Prof. Dr. med. U. Kindler

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen und
Transfusionsmedizin
der Medizinischen Einrichtungen der Universität
Düsseldorf

Isolierung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Gerinnungsfaktor VIII aus dem Plasma eines Patienten mit Hemmkörperhämophilie A

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Bernd Gonschior
1983

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Vorkommen und klinische Bedeutung von Antikörpern (Hemmkörper) gegen den Gerinnungsfaktor VIII	1
1.2	Grundzüge der Therapie	3
1.3	Faktor VIII als Reaktionspartner des Hemmkörpers	5
1.4	Chemisch-physikalische und immunologische Eigenschaften des Hemmkörpers	6
1.5	Zielsetzung	8
2	MATERIAL	10
3	ANALYTISCHE METHODEN	13
3.1	Proteinbestimmung	13
3.2	Quantitative Bestimmung der Immunglobuline	14
3.3	Bestimmung der Gerinnungsfaktor-VIII-Aktivität im Einphasentest	14
3.4	Bestimmung der Hemmkörperaktivität im Zweiphasentest	16
3.5	Bestimmung der Klassen- und Subklassenzugehörigkeit des Hemmkörpers	17
4	PRÄPARATIVE METHODEN	21
4.1	Isolierung der Immunglobulinfraktion aus Hemmkörperplasma	21
4.2	Isolierung des Hemmkörpers	22
4.2.1	Bildung und selektive Fällung des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII	23
4.2.2	Dissoziation des gefällten Immunkomplexes	24
4.2.3	Aufarbeitung des Dissoziates	26

		Seite
5	ERGEBNISSE	29
5.1	Ausbeute und Reinheit nach Isolierung der Immunglobulinfraktion aus Hemmkörperplasma	29
5.2	Optimale Bedingungen zur Dissoziation des Immunkomplexes	31
5.3	Ausbeute und Reinheit des Hemmkörpers nach selektiver Fällung des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII, Dissoziation des Immunkomplexes durch Inkubation mit Harnstoff	34
5.3.1	Einfluß des Waschens des gefällten Immunkomplexes mit polyäthylenglykolhaltigem Puffer auf Ausbeute und Reinheit	36
5.4	Reinigung des Dissoziates durch Gelfiltration	37
5.5	Reinigung des Dissoziates durch Binden der Fremdproteine an Ionenaustauscher	38
5.6	Synosis der Isolierung des Hemmkörpers	39
5.7	Klassen- und Subklassenzugehörigkeit des Hemmkörpers	40
6	DISKUSSION	44
7	ZUSAMMENFASSUNG	49
	LITERATURVERZEICHNIS	50

1 EINLEITUNG

1.1 Vorkommen und klinische Bedeutung von Antikörpern (Hemmkörper) gegen den Gerinnungsfaktor VIII

Antikörperbildung gegen den Gerinnungsfaktor VIII wird bei zwei Gruppen von Patienten beobachtet:
1. Bei Patienten mit Hämophilie A, die mit Faktor VIII substituiert werden, kommt es in 5 - 10 % der Fälle zur Bildung von Hemmkörpern. Die Antikörperbildung kann bei diesen Patienten als eine an sich physiologische Immunantwort des Organismus auf den ihm fremden Faktor VIII aufgefaßt werden. In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung, daß es vor 1964, als wegen des Fehlens hochaktiver Faktor-VIII-Präparationen nur wenig substituiert wurde, nur selten zur Hemmkörperbildung kam (1). Auch bei Patienten mit milder Hämophilie, die seltener substituiert werden müssen, wird nur gelegentlich ein Hemmkörper beobachtet (2).
2. Bei Patienten ohne primäre Hämophilie kann es vereinzelt ebenfalls zur Hemmkörperbildung kommen; vielfach besteht dann aber eine weitergehende Alteration des Immunsystems mit Auftreten von weiteren Autoimmunphänomenen. So worden Faktor-VIII-Antikörper beobachtet bei Rheumatischer Polyarthritis (3), Lupus erythematodes (4), Multipler Sklerose (5) u. a., ferner nach Arzneimittelallergien, insbesondere gegen Penicillin, aber auch nach Phenytoinbehandlung (6) und bei anderen Pharmaka. Hierbei könnte eine Antigengemeinschaft zwischen Medikament und Faktor VIII oder eine Haptenisierung des Medikaments mit Faktor VIII zur Antikörperbildung geführt haben; interessant ist in diesem Zusammenhang ein Hemmkörper, der nach einer Penicillinallergie auftrat und sich in vitro mit Penicillin und Cephalotin neutralisieren ließ (7).
Ferner kann es bei bis dahin gesunden Frauen nach Ent-

bindungen zu Hemmkörperbildung kommen. Die ersten Symptome treten dabei gewöhnlich 3 - 6 Monate post partum auf; die Krankheitsdauer schwankt zwischen einigen Monaten und 13 Jahren (8).
Schließlich sind Antikörperbildungen auch bei vorher gesunden älteren Menschen ohne erkennbare Ursache beschrieben worden (9).
Die Folge der Antikörperbildung bei bis dahin nicht hämophilen Patienten ist ein Absinken der Faktor-VIII-Aktivität auf hämostatisch unwirksame Werte und Auftreten von schweren hämorrhagischen Diathesen vom Hämophilietyp. Patienten mit bestehender Hämophilie fallen beim Auftreten von Hemmkörpern dadurch auf, daß der erwartete Anstieg der Faktor-VIII-Aktivität nach einer Substitution nicht mehr erfolgt; sondern die Aktivität bleibt niedrig und die Blutungsneigung besteht fort. Durch den Plasmatauschversuch nach DEUTSCH (10) kann das Vorliegen einer Hemmkörperhämophilie nachgewiesen werden. BIGGS und BIDWELL (11) haben ein Verfahren angegeben, mit dem sich die Hemmkörperaktivität quantitativ titrieren läßt.
Beide Gruppen von Patienten verhalten sich ähnlich: Eine Substitution mit geringen Mengen Faktor VIII führt nicht zu wirksamen Plasmaspiegeln, da der zugeführte Faktor VIII in kürzester Zeit vom Antikörper neutralisiert wird, sondern führt durch eine Boosterung zum Anstieg der Hemmkörperaktivität. Der Anstieg der Hemmkörperaktivität beginnt etwa eine Woche nach dem Substitutionsversuch und kann leicht zum 100-fachen des Ausgangswertes führen. In 3 - 9 Monaten sinkt der Titer wieder ab (12). Es gibt jedoch auch Patienten, deren Antikörpertiter nach Faktor-VIII-Exposition nicht oder nicht dramatisch steigt (12,13). Hinsichtlich der Immunantwort lassen sich nach ALLAIN die Patienten in zwei Gruppen einteilen: Bei den "high respondern" steigt der Titer rasch nach einer Expositionszeit von weniger als

22 Tagen an oder bleibt über Jahre hin hoch, während bei "low respondern" ein Titeranstieg erst bei einer Expositionszeit von 48 Tagen und mehr erfolgt und dann auch nicht so stark (13).

1.2 Grundzüge der Therapie

Eine Therapie von Patienten mit Hemmkörpern ist schwierig und muß zwei Ziele verfolgen:
1. Bei bestehenden gefährlichen Blutungen oder zur Durchführung von Operationen muß eine ausreichende Hämostase erreicht werden.
2. Der Hemmkörpertiter muß möglichst niedrig gehalten werden, um künftig notwendig werdende Blutstillungen nicht zu gefährden. Bei Hemmkörpern post partum kommt es zu Spontanheilungen (8), in Fällen mit Arzneimittelallergie verschwindet der Hemmkörper ebenfalls meist nach kurzer Zeit.

Zur Erzielung einer ausreichenden Hämostase läßt sich bei niedrigen Hemmkörpertitern durch Infusion hoher Dosen von AHG-(Faktor VIII)-Konzentraten der Antikörper neutralisieren und ein wirksamer Plasmaspiegel aufbauen. Wegen des erwähnten Titeranstiegs sollten Faktor VIII-Infusionen nur bei zwingender Indikation erfolgen (14). Bei "low respondern" kann die Indikation großzügiger gestellt werden (12). In einigen Fällen kann statt humanem auch AHG vom Schwein indiziert sein: wenn humanes nicht zur Verfügung steht oder wenn der Hemmkörper eine wesentlich höhere Affinität zum humanen als zum tierischen AHG aufweist (15,20).

Bei hohen Antikörpertitern gelingt es nicht, den Hemmkörper mit Faktor VIII zu neutralisieren. In diesem Fall sind zwei Wege gangbar:
1. Durch Plasmatausch mittels eines Zellseparators wird der Titer so weit gesenkt, daß AHG eingesetzt werden kann (16,17,18,19). Zur Vorbereitung auf aufschiebbare Operationen oder im blutungsfreien Intervall verwendet

man ein Faktor-VIII-freies Austauschmittel; die Plasmapherese kann in wöchentlichem Abstand wiederholt werden, bis der Titer genügend abgesunken ist. Unmittelbar vor der Operation infundiert man dann AHG (16,17). Bei bestehenden Blutungen verwendet man Plasma oder Humanalbumin mit Zusatz von Kryoglobulin zum Austausch, da hier neben einer Verdünnung des Antikörpers auch seine Neutralisation zum raschen Senken des Hemmkörpertiters beiträgt (17,18).

2. Bei Patienten mit Hemmkörpern lassen sich Blutungen durch Infusion von aktiviertem Prothrombinkomplex zum Stehen bringen (21,22,23). Der Vorteil besteht darin, daß der Hemmkörpertiter nicht ansteigt, der Nachteil darin, daß der Therapieerfolg nur klinisch, nicht aber im Gerinnungslabor kontrolliert werden kann. Ferner ist der Wirkungsmechanismus nicht bekannt. Bei Patienten ohne Hemmkörper kann es nach Infusion von aktiviertem Prothrombinkomplex zu Thrombosen und zu disseminierter intravasaler Gerinnung kommen. Bei Hemmkörperpatienten wurden diese Komplikationen bisher nicht beobachtet (22). Dennoch sollen bei dieser Therapie gleichzeitig Fibrinolysehemmer nicht gegeben werden (23).

Der Anstieg des Hemmkörpertiters nach AHG-Infusionen kann in vielen Fällen durch eine Kombination mit immunsuppressiver Therapie vermieden werden. Corticosteroide oder Azathioprin allein sind in den meisten Fällen unwirksam (14,24,25), eine Kombination von beiden kann bei Patienten mit spontaner Hemmkörperbildung wirksam sein (9). Die meisten Erfolge wurden jedoch durch eine Kombination der AHG-Infusion mit Cyclophosphamid beschrieben (24,25,26). Einige Autoren gaben Cyclophosphamid als einmalige Dosis (24), eine häufigere Gabe scheint aber wirkungsvoller zu sein (24,25). HRUBY (27) fand allerdings, daß der Titerverlauf nach Cyclophosphamid nicht beeinflußt wird. Bei den von NILSSON (26) und HULTIN (24) beschriebenen Fällen scheint es, als seien die erfolgreich behandelten Patienten als "low responder", die Therapieversager als "high responder" einzustufen.

1.3 Faktor VIII als Reaktionspartner des Hemmkörpers (28)

Das Faktor-VIII-Molekül besteht aus einer hochmolekularen und einer niedermolekularen Untereinheit. Beide haben verschiedene Syntheseorte und vereinigen sich erst im strömenden Blut zum vollständigen Molekül.
Die größere Untereinheit läßt sich mit heterologen, durch Immunisierung von Tieren mit hochgereinigten menschlichen Faktor VIII gewonnenen Antiseren mittels präzipitierender immunologischer Techniken qualitativ und quantitativ bestimmen; sie wird als Faktor $VIII_{AP}$ (Faktor VIII-assoziiertes Protein) bezeichnet. Dieses Molekül findet sich im Plasma und Serum von Gesunden und auch von Patienten mit Hämophilie A; es ist jedoch bei Patienten mit von-Willebrand-Syndron vermindert oder fehlt. Die Symtome bei von-Willebrand-Syndron lassen sich durch Zufuhr dieses Moleküls beseitigen, das in dieser Eigenschaft auch als Faktor $VIII_{vWF}$ (von-Willebrand-Faktor) bezeichnet wird.
Eine weitere wichtige Eigenschaft der größeren Untereinheit des Faktor VIII-Moleküls führt dazu, daß Thrombocyten durch das Antibiotikum agglutiniert werden; diese Aktivität läßt sich als Faktor $VIII_{RISTO}$ im Labor bestimmen.
Die kleinere Untereinheit des Faktor VIII-Moleküls ist Träger der plasmatischen Gerinnungsaktivität des Faktors VIII und wird in dieser Funktion als Faktor $VIII_{coag}$ bestimmt; sie ist bei Hämophilie A vermindert. Das Molekül wird während des Gerinnungsvorganges so verändert, daß eine Gerinnungsaktivität im Serum nicht mehr nachweisbar ist.
Die kleinere Untereinheit ist es auch, die mit dem Hemmkörper reagiert und diesen einerseits dabei neutralisiert, andererseits selbst die Gerinnungsaktivität einbüßt. Die größere Untereinheit nimmt an dieser Reaktion nicht teil. Die hemmkörperneutralisierende Wirkung der kleineren Untereinheit wird als Faktor $VIII_{NEUT}$ bezeichnet; sie ist - im

Gegensatz zur Gerinnungsaktivität - auch im Serum nachweisbar. Bei einem Teil von Patienten mit Hämophilie läßt sich Faktor $VIII_{NEUT}$ ebenfalls nachweisen. Hämophilien, bei denen Faktor $VIII_{NEUT}$ nachweisbar ist, werden als Hamophilie A^+ von den übrigen als Hämophilie A^- bezeichneten Gerinnungsstörungen abgegrenzt.

1.4 Chemisch-physikalische und immunologische Eigenschaften des Hemmkörpers

Faktor-VIII-Antikörper sind relativ stabil: Sie sind gegen Erhitzen auf 65°C beständig und werden von Säuren und Basen in einem pH-Bereich von 4 - 9 nicht denaturiert. Sie sind nicht dialysierbar und werden von $Al(OH)_3$ nicht absorbiert.

Bis auf ganz wenige Ausnahmen gehören die Hemmkörper den Immunglobulinen der Klasse IgG an. Die vereinzelt bei monoklonalen Gammopathien beschriebenen, den Klassen IgA oder IgM angehörenden und die Faktor-VIII-Aktivität hemmenden pathologischen Immunglobuline inhibieren diese nur unvollständig und reversibel. Es ist fraglich, ob es sich hier um echte Hemmkörper handelt; eher dürfte die Gerinnungsaktivität des Faktors VIII hier in einer nichtimmunologischen Reaktion blockiert werden.

Die Reaktion der Hemmkörper mit Faktor VIII führt nicht zu sichtbaren Präzipitaten. LAZARCHIK (29) hat dieses Phänomen näher untersucht: Durch Gelfiltration hat der Autor den Immunkomplex abgetrennt; dieser eluierte spät, hatte also ein niedriges Molgewicht und war heterogen. Aus dem niedrigen Molgewicht von 100 000 bis 200 000 schließt der Autor, daß der Reaktionspartner des Hemmkörpers diesem gegenüber monovalent sei. POOL (30) hat drei Hemmkörper untersucht und gefunden, daß der Hemmkörper mit 1 bis 3 Bindungsstellen des Faktor $VIII_{NEUT}$ reagiert.

Die Reaktion von Hemmkörper und Faktor VIII verläuft temperatur-, zeit- und konzentrationsabhängig. Ein Teil

der Hemmkörper zeigt eine Reaktion 2. Ordnung, bei der Faktor VIII vollständig inaktiviert wird, wenn die Konzentration des Hemmkörpers hoch genug ist. Ein anderer Teil inaktiviert auch in hoher Konzentration Faktor VIII nur unvollständig. Diese Antikörper bilden wahrscheinlich Komplexe mit Faktor VIII, die noch eine Gerinnungsaktivität besitzen. Solche Hemmkörper sollen bei nicht primär hämophilen Patienten vorherrschen (31,32).
Im allgemeinen wird das Komplementsystem durch die Immunkomplexe aus Hemmkörper und Faktor VIII nicht aktiviert. Neuerdings gelang KAZATCHKIN (33) durch Fällung zirkulierender Immunkomplexe aus dem Plasma multitransfundierter hämophiler Patienten in einigen Fällen der Nachweis von fixiertem $C1_q$ in diesen Komplexen; möglicherweise kommt es also bei einem Teil der Patienten doch zu einer Komplementaktivierung.
Bestimmungen der Leicht- und Schwerketten von Hemmkörpern wurden durchgeführt, um festzustellen, wieweit diese Hemmkörper homogen oder gar monoklonal sind. Dabei zeigte sich, daß Hemmkörper bei Patienten ohne primäre Hämophilie sehr heterogen sind, während bei Hämophilie das Spektrum der vorhandenen Ketten viel einheitlicher ist. Die Hemmkörper hämophiler Patienten enthalten als Leichtkette fast ausschließlich alleine die κ-Kette. Bei primär nichthämophilen Patienten finden sich in etwa der Hälfte der untersuchten Fälle beide Leichtketten, bei den übrigen vorwiegend κ-Ketten (34,35,36,37,38,39, 40,41). Die Schwerketten wurden bisher bei 18 Patienten mit Hämophilie und bei 14 Patienten ohne zugrundeliegende Hämophilie untersucht. Bei allen hämophilen Patienten wurde die γ_4-Kette gefunden, 5 Patienten hatten zusätzlich γ_1-Ketten, bei 3 Patienten fanden sich γ_3- und γ_4-Ketten nebeneinander. Bei den nichthämophilen Patienten fanden sich nur drei, die ausschließlich die γ_4-Kette hatten. Bei 7 Patienten fand sich eine Kombination von γ_1- und γ_4-Ketten, je ein Patient hatte nur die γ_3-Kette, eine Kombination von γ_3- und γ_4-, bzw. eine Kombination

von γ_1-, γ_3- und γ_4-Ketten. Auf den Seiten 46 und 47 sind die untersuchten Fälle übersichtlich aufgelistet.

1.5 Zielsetzung

Verschiedene Untersuchungen an Hemmkörpern waren dadurch erschwert, daß keine geeigneten Isolierungsmethoden zur Verfügung standen.
So konnten Leicht- und Schwerketten bisher nur aus Hemmkörperplasmen mit hoher Hemmkörperaktivität bestimmt werden, da die Proben zur Bestimmung so stark verdünnt werden müssen, daß ihr Immunglobulingehalt der Kapazität der zur Untersuchung verwendeten Antiseren entspricht und trotz der Verdünnung eine Hemmkörperaktivität noch meßbar bleibt. Es wäre denkbar, daß sich bei der Untersuchung von Patienten mit niedrigen Hemmkörpertitern ("low responder"!) andere Verteilungen der Ketten finden könnten.
1976 wurde dann erstmals ein Verfahren zur Isolierung der Hemmkörper beschrieben (39). Dabei wurde zunächst die IgG-Fraktion aus dem Plasma gewonnen, durch Inkubation mit Faktor VIII wurde der Immunkomplex gebildet, dieser wurde durch Zugabe von Polyäthylenglykol selektiv gefällt und abzentrifugiert, wobei die anderen Immunglobuline weitgehend im Überstand verblieben, und schließlich wurde der Immunkomplex nach Auflösen in Puffer durch halbstündiges Erhitzen auf 56°C dissoziiert und damit der Hemmkörper zurückgewonnen.
1978 wurden zwei weitere Verfahren veröffentlicht, die ebenfalls auf der Bildung des Immunkomplexes zwischen Hemmkörper und Faktor VIII beruhen (42): Im ersten dieser Verfahren wird der Immunkomplex durch eine Gelfiltration von begleitenden fremden Immunglobulinen getrennt und durch Ansäuern dissoziiert; im zweiten Fall wurde Faktor VIII immobilisiert, indem er an Anti-Faktor-VIII$_{vWF}$ der Ziege gebunden wurde, welches seinerseits an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt worden war. Über die so vorbereitete Säule wurde die hemmkörperhaltige Probe filtriert,

wobei der Hemmkörper gebunden wurde, während die anderen Immunglobuline ausgeschlossen wurden. Durch Elution mit $MgCl_2$-Lösung wurde der Immunkomplex aus Faktor VIII und Hemmkörper ausgewaschen und durch Ansäuern dissoziiert. Leider setzen diese beiden eleganten Verfahren Proben mit hoher Hemmkörperaktivität voraus, während die 1976 veröffentlichte Methode auch für kleine Probenvolumina mit geringer Hemmkörperaktivität geeignet ist.
Ein weiteres, 1979 veröffentlichtes Verfahren führt zu einer Teilreinigung des Hemkörpers (43). Es beruht auf der Chromatographie über Protein-A-Sepharose, die eine hohe Affinität zu den IgG-Schwerketten γ_1, γ_2 und γ_4 hat, andere Immunglobuline jedoch nicht bindet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Hemmkörper aus einer Probe mit niedriger Hemmkörperaktivität zu isolieren und ihn durch die Bestimmung der in ihm enthaltenen Leicht- und Schwerketten zu charakterisieren. Zur Isolierung wird die 1976 von LAVERGNE (39) beschriebene Methode zugrunde gelegt. Diese Methode wird durch eine Modifikation für Hemmkörper mit hoher Affinität zum Faktor VIII anwendbar gemacht, die Leistungsfähigkeit der modifizierten Methode wird anhand des Anreicherungsfaktors des Hemmkörpers, bezogen auf den Immunglobulingehalt und bezogen auf den Gesamtproteingehalt sowie anhand der erzielbaren Ausbeute bestimmt.

2 MATERIAL

2.1 zur Bestimmung der Immunglobuline mittels der radialen Immundiffusion (Mancini-Technik):

2.1.1. Tri-Partigen IgA-Platten (Behringwerke, Marburg)
2.1.2 Standardlösungen IgA (Behringwerke, Marburg)
2.1.3 HC-Partigen IgG-Platten (Behringwerke, Marburg)
2.1.4 Standardlösungen IgG (Behringwerke, Marburg)
2.1.5 Tri-Partigen IgM-Platten (Behringwerke, Marburg)
2.1.6 Standardlösungen IgM (Behringwerke, Marburg)

2.2 zur Bestimmung der Gerinnungsfaktor-VIII-Aktivität im Einphasentest:

2.2.1 Diäthylbarbital-Acetatpufferlösung pH 7,6 für Gerinnungsteste (Behringwerke, Marburg)
2.2.2 Serumalbumin vom Rind, reinst, lyophilisiert (Behringwerke, Marburg)
2.2.3 Faktor-VIII-Mangelplasma (Behringwerke, Marburg)
2.2.4 Pathromtin, Partielles Thromboplastinreagenz (Behringwerke, Marburg)
2.2.5 Kaolinsuspension (Behringwerke, Marburg)
2.2.6 Kalziumchloridlösung, 0,025 molar, für Gerinnungsanalysen (Behringwerke, Marburg)
2.2.7 Standard-Humanplasma (Behringwerke, Marburg)

2.3 zur Bestimmung der Faktor-VIII-Hemmkörperaktivität wurden neben den unter 2.2 aufgeführten Materialien verwendet:

2.3.1 Aluminiumhydroxyde moist gel (BDH Chemicals Ltd., Poole, Großbritanien)
2.3.2 Faktor-VIII-Konzentrat, lyophilisiert (Behringwerke, Marburg)

2.4 Zur Bestimmung der Leicht- und Schwerkettenzusammensetzung des Hemmkörpers wurden neben den unter 2.2 und 2.3 aufgeführten Materialien verwendet:

2.4.1 Antiserum vom Kaninchen gegen humanes IgG (Behringwerke, Marburg)

2.4.2 Antiserum vom Kaninchen gegen humanes IgA (Behringwerke Marburg)

2.4.3 Antiserum vom Kaninchen gegen humanes IgM (Behringwerke, Marburg)

2.4.4 Antiserum vom Kaninchen gegen humane κ-Ketten (Behringwerke, Marburg)

2.4.5 Antiserum vom Kaninchen gegen humane λ-Ketten (Behringwerke, Marburg)

2.4.6 Antiseren vom Schwein gegen die humanen Schwerketten $\gamma 1$ - $\gamma 4$: Plasma Protein Antisera to Subclasses of Human IgG (Nordic Immunological Laboratories, in der Bundesrepublik vertreten durch Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach - Steinberg)

2.4.7 Citratplasma mit normalem IgG-Gehalt, hemmkörperfrei (eigenes Plasma)

2.5 Hemmkörperplasma: Das Plasma stammt von einem multitransfundiertem Patienten mit Hämophilie A und wurde durch Plasmatausch mittels Zellseparator gewonnen.

2.6 Material zur Isolierung der Immunglobulinfraktion:

2.6.1 Aluminiumhydroxyde moist gel (BDH Chemicals Ltd., Poole, Großbritanien)

2.6.2 Ammoniumsulfat, p.A. (Merck, Darmstadt)

2.6.3 Ammoniaklösung, min. 25 %, p.A. (Merck, Darmstadt)

2.6.4 Natriumchlorid, p.A. (Merck, Darmstadt)

2.6.5 n-Octansäure für biochem. Zwecke, (Merck, Darmstadt)

2.6.6 Natriumacetat, krist., p.A. (Merck, Darmstadt)

2.6.7 Natronlauge, 1 molar, p.A. (Merck, Darmstadt)

2.6.8 Glaswolle (Merck, Darmstadt)

2.7 Material zur Bildung und Fällung des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII:

2.7.1 Faktor-VIII-Konzentrat, lyophilisiert (Behringwerke, Marburg)

2.7.2 HEPES: N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthansulfonsäure (Serva, Heidelberg)

2.7.3 Polyäthylenglykol Type 6000 (Molgew.: 6000 - 7500, Fp.: 60 - 63°C) (Serva, Heidelberg)

2.7.4 Harnstoff, p.A. (Merck, Darmstadt)

2.8 Material zur Aufarbeitung des Dissoziats:

2.8.1 Sepharose 6 B CL (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

2.8.2 DEAE-Biogel A, 100 - 200 mesh, wet (Biorad laboratories, Richmond, Calif., USA)

2.8.3 di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.A. (Merck, Darmstadt)

2.8.4 Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat p.A. (Merck, Darmstadt)

3 ANALYTHISCHE METHODEN

3.1 Proteinbestimmung (44)

Proteinkonzentrationen wurden über eine Extinktionsmessung bei 280 nm photometrisch bestimmt.
Prinzip: Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan haben nahe 280 nm ein schmalbandiges Absorbtionsmaximum. Der Einfluß anderer Aminosäuren und Verunreinigungen, die breitbasig um die Wellenlänge von 280 nm absorbieren, wird dadurch eliminiert, daß man die Extinktionen, die jeweils 20 nm über und unter der Wellenlänge des Extinktionsmaximums gemessen werden, vom Doppelten der maximalen Extinktion abzieht gemäß der Formel:

$$\Delta_E = 2\,E_{(280)} - E_{(260)} - E_{(300)}$$

Δ_E ist somit proportional der Konzentration an aromatischen Aminosäuren im Ansatz; bei bekanntem Gehalt eines Proteins an diesen Säuren kann man umrechnen.
Durchführung: Die Proben wurden ausreichend verdünnt, in eine Küvette gegeben und diese in den Meßstrahl eines Spektralphotometers gesetzt. In den Referenzstrahl wurde eine gleichartige Küvette mit der Verdünnungsflüssigkeit gebracht. Die Extinktion wurde, bei 320 nm beginnend, auf einem Papierstreifen so registriert, daß 20 mm Papiervorschub einer Abnahme der Wellenlänge von 20 nm entsprachen. Bei einer Wellenlänge von etwa 250 nm wurde die Messung beendet.
Auswertung: Die registrierte Kurve wurde ausgemessen, Δ_E wurde errechnet. Eine Albuminlösung mit 1 mg/ml ergibt ein Δ_E von 0,34. Der Proteingehalt ergibt sich damit aus

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\Delta_E \cdot \text{Verdünnung}}{0{,}34},$$

wobei unterstellt wird, daß das zu messende Protein einen ähnlichen Gehalt an Tyrosin und Tryptophan hat wie Albumin.

.2 Quantitative Bestimmung der Immunglobuline

Die Immunglobuline IgG, IgA und IgM wurden mit Hilfe der radialen Immundiffusion (Mancini-Technik) quantitativ bestimmt (45).

Prinzip: Läßt man eine Probe von einer ausgestanzten Auftragstelle aus radial in ein homogenes, gleichmäßig dickes Agargel diffundieren, welches einen präzipitierenden Antikörper enthält, der mit einem gelösten Bestandteil der Probe spezifisch reagiert, so bildet sich eine ringförmige Präzipitationslinie, die nach ausreichend langer Diffusionszeit nicht mehr weiterwandert. Die von dieser Präzipitationslinie eingeschlossene Fläche ist der Menge des in der Probe enthaltenen Reaktionspartners proportional.

Durchführung: In drei der zwölf Auftragstellen der aus dem Handel bezogenen gebrauchsfertigen Partigenplatten wurden je 5 μl Standardlösung mit unterschiedlicher, bekannter Konzentration an entsprechenden Immunglobulinen gebracht, in die übrigen Auftragstellen je 5 μl der zu untersuchenden Proben. Zur Diffusion wurden die Platten drei Tage lang auf genau horizontal ausgerichteten Arbeitsplatten stehen gelassen.

Auswertung: Die Durchmesser der Präzipitationsringe wurden mit einem Ablesegerät ausgemessen, die Meßwerte wurden quadriert, aus den Werten der Standardlösungen wurde für jede Platte eine Eichkurve angefertigt und die Konzentrationen der in den Proben enthaltenen Immunglobuline mittels dieser Eichkurven graphisch ermittelt.

.3 Bestimmung der Gerinnungsfaktor-VIII-Aktivität im Einphasentest (46,47)

Prinzip: Ein hemmkörperfreies Faktor-VIII-Mangelplasma mit einer Restaktivität unter 0,01 WHO-Einheiten Faktor $VIII_{coag}$ wird mit einer geeigneten Verdünnung der zu untersuchenden Probe und mit Kaolinsuspension und Phospholipiden zur Aktivierung des endogenen Gerinnungssystems eine definierte Zeit bei 37°C inkubiert und dann rekalzifiziert;

die Gerinnungszeit wird gemessen. Die Verdünnung der Probe wird so gewählt, daß die Faktor-$VIII_{coag}$-Konzentration im Ansatz zur limitierenden Größe der Gerinnungszeit wird; die Gerinnungszeit wird unter diesen Bedingungen eine Funktion der Faktor-$VIII_{coag}$-Konzentration.

Durchführung:

0,1 ml verd. Probe,

0,1 ml Faktor-VIII-Mangelplasma und

0,1 ml PTT-Reagenz (Pathromtin, gelöst in Kaolinsupension) wurden 6 Minuten bei 37°C inkubiert,

0,1 ml Kalziumchloridlösung, 0,025 molar, zugesetzt und die Gerinnungszeit an einem Schnitger und Gross - Koagulometer bestimmt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, die wiederholt wurden, wenn die gemessenen Gerinnungszeiten mehr als 0,5 Sekunden voneinander abwichen. Die Mittelwerte der Einzelmessungen wurden zur Auswertung herangezogen.

Zur Verdünnung der Proben wurde Diäthylbarbital-Acetatpuffer pH 7,6 für Gerinnungsanalysen verwendet, dem 1 % Rinderalbumin zur Stabilisierung des empfindlichen Faktor VIII zugesetzt war. Proben, die weniger als 1 E/ml Faktor $VIII_{coag}$ enthielten, wurden 1 : 5 verdünnt; Proben mit höherer Aktivität entsprechend stärker.

Auswertung: Die Faktor-VIII-Aktivität wurde anhand von Eichkurven graphisch ermittelt.

Aufstellung der Eichkurve: Handelsübliches lyophilisiertes Standardplasma wurde nach Vorschrift des Herstellers gelöst, eine Verdünnungsreihe im oben beschriebenen Puffer hergestellt (1:5, 1:10, 1:50 und 1:100) und anschließend die Gerinnungszeiten für diese Verdünnungen wie oben beschrieben gemessen. Die gemessenen Zeiten wurden auf doppelt logharithmisch geteiltem Papier gegen die in den Verdünnungen enthaltenen Aktivitäten aufgetragen, die gefundenen Punkte wurden zu einer Kurve verbunden, welche bei exaktem Arbeiten eine Gerade ergibt.

3.4 Bestimmung der Hemmkörperaktivität im Zweiphasentest (11)

Prinzip: Eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe wird mit jeweils gleichem Volumen einer Faktor-VIII-Lösung mit 2 E/ml Faktor $VIII_{coag}$ versetzt, so daß durch die Mischung in jedem Ansatz zunächst eine Faktor-VIII-Aktivität von 1 E/ml vorhanden ist. Nach 2 Std. Inkubation bei 37°C wird die Restaktivität des Faktors VIII bestimmt. Wenn unter diesen Bedingungen 0,5 E/ml Faktor-VIII-Aktivität neutralisiert worden sind, hat die für diesen Ansatz verwendete Verdünnung der Probe definitionsgemäß eine Hemmkörperaktivität von 1 E/ml.

Durchführung:

Probenvorbereitung:

1 ml Plasma wurde mit

0,1 ml 2 %iger Aluminiumhydroxydsuspension in phys. Kochsalzlösung 10 Min. geschüttelt, das Aluminiumhydroxyd wurde dann 15 Min. bei 3000 Upm. abzentrifugiert.

Faktor-VIII-Lösung mit 2 E/ml: Ein kommerzielles, lyophilisiertes Faktor-VIII-Konzentrat mit

500 E Faktor VIII wurde in

50 ml dest. Wasser gelöst und zu Portionen à 1 ml tiefgefroren (="Faktor-VIII-Stammlösung"). Die Aktivität einer 5 Min. im Wasserbad bei 37°C getauten Probe wurde bestimmt. Anhand der gefundenen Aktivität wurden 5 Min. im Wasserbad aufgetaute Proben der Stammlösung mit Puffer (siehe unten) so verdünnt, daß eine Aktivität von 2 E/ml resultierte. Diese Faktor-VIII-Gebrauchslösung wurde unmittelbar vor jedem Test frisch zubereitet.

Verdünnungsreihe: Die vorbehandelte Probe wurde mit Diäthylbarbital-Acetatpuffer pH 7,6 für Gerinnungsanalysen, dem zur Stabilisierung von Faktor VIII 1 % Rinderalbumin zugesetzt war, geometrisch verdünnt.

Inkubation mit Faktor VIII: Je 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe sowie 0,1 ml Puffer als Blindwert wurden mit 0,1 ml der Faktor-VIII-Gebrauchslösung 2 Std. im verschlossenem Röhrchen im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 0,8 ml Puffer zugegeben und die Faktor-VIII-Aktivität mittels des unter 3.3 beschriebenen Einphasentestes bestimmt.
Auswertung: Auf Millimeterpapier wurden die Restaktivitäten gegen die jeweilige Verdünnung aufgetragen und die gefundenen Punkte zu einer Kurve verbunden. Es wurde die Verdünnung abgelesen, an deren Stelle die Restaktivität 0,5 E/ml beträgt; dieser Verdünnungsfaktor wurde als Hemmkörperativität in E/ml angegeben.

3.5 Bestimmung der Klassen- und Subklassenzugehörigkeit des gereinigten Hemmkörpers

Prinzip: Verdünnungen der Hemmkörperpräparation werden mit spezifischen Antiseren gegen Immunglobulinklassen und -subklassen inkubiert, nach Abzentrifugation entstandener Präzipitate wird Faktor VIII zugesetzt und erneut inkubiert. Die Restaktivität des Faktor VIII wird bestimmt und mit Ansätzen verglichen, bei denen das spezifische Antiserum durch Puffer ersetzt war. Gehört der Hemmkörper einer Klasse oder Subklasse an, gegen die sich das Antiserum richtet, so wird er von diesem Antiserum präzipitiert und kann dann seinerseits im zweiten Schritt keinen oder weniger Faktor VIII neutralisieren, so daß die Faktor-VIII-Restaktivität hoch ist, verglichen mit dem Ansatz, der Puffer anstelle des Antiserums enthielt.
Da nicht auszuschließen ist, daß niedermolekulare Immunkomplexe aus Hemmkörper und gegen ihn gerichtetem Antikörper des spezifischen Antiserums, die nicht präzipitieren und somit nicht durch Zentrifugation aus dem Ansatz entfernt werden können, noch die Fähigkeit zur Neutralisation von Faktor VIII besitzen, wurde jeweils eine Verdünnungsreihe des Hemmkörpers mit dem Antiserum inkubiert, so daß angenommen werden kann, daß innerhalb

der Verdünnungsreihe einige Ansätze dem Äquivalenzpunkt nahekommen, bei den große, präzipitierende Immunkomplexe entstehen, die sich abzentrifugieren lassen.
In Vorversuchen, bei denen eine Faktor-VIII-Lösung mit den Antiseren inkubiert wurde und dann die Restaktivität bestimmt wurde, zeigte sich, daß einige Antiseren zu einer scheinbaren Vermehrung der Faktor-VIII-Aktivität führten, d. h. es wurden zu hohe Restaktivitäten gefunden. Es war nicht möglich, durch eine Vorbehandlung diesen Effekt zu verhindern. Möglicherweise ist dieser Effekt darauf zurückzuführen, daß das Antiserum mit Immunglobulinen des Faktor-VIII-Mangelplasmas reagiert und es hierbei über eine Aktivierung des im Mangelplasma enthaltenen Komplements auch zu einer Aktivierung von Gerinnungsfaktoren kommt. Es wurde deshalb versucht, den Überschuß der Antikörper aus den verwendeten Antiseren aus den Ansätzen zu entfernen, bevor die Faktor-VIII-Restaktivität gemessen wurde, indem humane Immunglobuline zugesetzt wurden, die die überschüssigen Antikörper der verwendeten Antiseren präzipitieren, so daß sie durch Zentrifugation entfernt werden konnten. Die humanen Immunglobuline wurden der Faktor-VIII-Lösung zugesetzt. Durch diese Maßnahmen gelang es, die unspezifische scheinbare Erhöhung der Faktor-VIII-Restaktivität durch die Antiseren einzuschränken, wenngleich die Blindwerte aus Antiserum, Faktor VIII und humanem Immunglobulin dennoch etwas höher ausfielen als die Blindwerte, bei denen das Antiserum durch Puffer ersetzt war. Diese Tatsache mußte bei der Auswertung berücksichtigt werden.
Durchführung:
Vorbehandlung der Antiseren: Durch die Vorbehandlung sollen die in den Antiseren vorhandenen Gerinnungsfaktoren, Proteasen und Konservierungsstoffe, die die Faktor-VIII-Bestimmung stören, entfernt werden. Lyophilisierte Antiseren wurden zunächst in dest. Wasser gelöst.

Je

1 ml Antiserum wurde mit

0,1 ml 25%iger Aluminiumhydroxydsuspension in phys. Kochsalzlösung 30 Min. geschüttelt, 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert, der Rückstand wurde verworfen. Der Überstand wurde im Wasserbad 30 Min. auf 56°C erhitzt, danach wurde er erneut 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert. Der Überstand wurde 24 Std. bei 4°C gegen phys. Kochsalzlösung dialysiert. Bis zum Gebrauch wurden die so präparierten Antiseren tiefgefroren.

Immunglobulinhaltige Faktor-VIII-Lösung mit 2 E/ml Faktor $VIII_{coag}$:

10 ml eigenes Citratplasma wurden mit

1 ml 25%iger $Al(OH)_3$-Suspension in phys. Kochsaltzlsg. 30 Min. geschüttelt, 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert, der Überstand wurde 30 Min. auf 56°C erhitzt, anschließend wurde erneut 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde die Faktor-VIII-Stammlösung (siehe S. 15) auf eine Aktivität von 2 E/ml verdünnt.

Verdünnungsreihe und Inkubation mit den Antiseren: Der gereinigte Hemmkörper wurde mit Diäthylbarbital-Acetatpuffer pH 7,6 für Gerinnungsanalysen, dem zuvor 1 % Rinderalbumin zur Stabilisierung des Faktors VIII zugesetzt worden war, 1:2 bzw. 1:4 verdünnt. Je 0,1 ml des unverdünnten und verdünnten Hemmkörpers bzw. des oben erwähnten Puffers als Blindwert wurden mit 0,1 ml jedes Antiserums rsp. Puffers nach folgendem Schema 2 Std. bei 37°C inkubiert:

	HEMMKÖRPERVERDÜNNUNG			
ANTISERUM	1:1 (unverdünnt)	1:2	1:4	Puffer
Anti-IgA				
Anti-IgM				
Anti-IgG				
Anti-κ				
Anti-λ				
Anti-γ_1				
Anit-γ_2				
Anti-γ_3				
Anti-γ_4				
Puffer				

Anschließend wurden alle Ansätze 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert.
Inkubation mit Faktor VIII: Je 0,1 ml der Überstände wurden mit 0,1 ml der oben beschriebenen immunglobulinhaltigen Faktor-VIII-Lösung im Wasserbad 2 Std. bei 37°C inkubiert, es wurden jeweils 0,8 ml Puffer zugesetzt, 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert und aus den Überständen die Faktor-VIII-Restaktivität durch den unter 3.3 beschriebenen Einphasentest bestimmt.
Auswertung: Wegen der auf S. 17 erwähnten unspezifischen scheinbaren Aktivitätssteigerung des Faktors VIII durch die verwendeten Antiseren, die sich auch in der Erhöhung der Restaktivitäten der Ansätze aus Antiserum, Puffer und Faktor VIII verglichen mit dem Ansatz, der Puffer anstelle des Antiserums enthielt, zeigte, ließen sich die Restaktivitäten der Ansatzreihen der einzelnen Antiseren nicht ohne weiteres untereinander und mit der Ansatzreihe vergleichen, die anstelle eines Antiserums Puffer enthielt. Um den Einfluß der unspezifischen Aktivitätssteigerung auszuschalten und die Werte vergleichbar zu machen, wurden die Restaktivitäten jeder Ansatzreihe auf den zugehörigen Blindwert bezogen, indem der Quotient aus der jeweiligen Restaktivität und dem zugehörigen Blindwert gebildet wurde. Die so erhaltenen Werte wurden auf Millimeterpapier gegen die Verdünnungsstufe des Hemmkörpers aufgetragen und die Punkte für jede Ansatzreihe zur Kurve verbunden.
Die Kurven der Ansatzreihen der Antiseren, mit denen der Hemmkörper nicht reagierte, lagen alle nahe der Kurve der Ansatzreihe, die mit Puffer anstelle eines Antiserums angesetzt worden war, während die Kurven der Ansatzreihen der Antiseren, die den Hemkörper neutralisierten, deutlich höhere Werte hatten und deutlich aus den übrigen Kurven herausfielen.

4 PRÄPARATIVE METHODEN

4.1 Isolierung der Immunglobulinfraktion aus Hemmkörperplasma

Die Immunglobuline wurden mit der geringfügig modifizierten Methode von FEIN und STEINBUCH aus dem Hemmkörperplasma isoliert (48,39).

Prinzip: Proteasen und der Prothrombinkomplex werden durch Absorbtion an Aluminiumhydroxyd abgetrennt; hitzelabile Plasmabestandteile werden durch Erhitzen denaturiert und fallen aus; Albumin wird abgetrennt, indem die übrigen Proteine mit Ammoniumsulfat ausgesalzt, abzentrifugiert und wieder gelöst werden; Lipoproteide werden durch Fällung mit n-Octansäure abgetrennt.

Durchführung: Zu 100 Teilen Plasma wurden 7 Teile (V/V) 25%ige Aluminiumhydroxydsuspension in phys. Kochsalzlsg. gegeben, 10 Min. bei Raumtemperatur gerührt, 20 Min. bei 8000 g und 10°C zentrifugiert; der Rückstand wurde verworfen.

Der Überstand wurde 30 Min. im Wasserbad auf 56°C erwärmt und 30 Min. bei 8000 g und 10°C zentrifugiert; der Rückstand wurde verworfen.

Zum Überstand wurde eine 40%ige Ammoniumsulfatlösung, die mit Ammoniaklösung auf pH 7,4 eingestellt worden war, bis zu einer Endkonzentration von 25 % unter gutem Rühren bei Raumtemperatur getropft. Es wurde noch 30 Min. nachgerührt und dann 30 Min. bei 8000 g und 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Testen des Immunglobulingehaltes verworfen; er enthielt keine Immunglobuline. Der Rückstand wurde in 25%iger, mit Ammoniak auf pH 7,4 eingestellter Ammoniumsulfatlösung, deren Volumen etwa einem Viertel der Ammoniumsulfatlösung vor der Zentrifugation entsprach, suspendiert, 5 Min. intensiv durchgeschüttelt und 30 Min. bei 8000 g und 5°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt keine Immunglobuline und wurde verworfen.

Der Rückstand wurde in 0,15 molarer Kochsalzlösung mit gleichem Volumen wie das verwendete Plama gelöst, die Lösung wurde 3 Std. bei Raumtemperatur und 18 Std. bei 5°C gegen 0,15 molare Kochsalzlösung dialysiert.

Zum Dialysat wurden unter Rühren 0,2 ml n-Octansäure pro ml Dialsat getropft; durch portionsweise Zugabe von Natriumacetat in Substanz wurde der pH-Wert dabei auf 4,6 gehalten. Es wurde noch 20 Min. nachgerührt und dann 30 Min. bei 8000 g und 10°C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Schichten: Die feste Phase schwamm auf der flüssigen und wurde ihrerseits von einer dünnen Schicht klarer, überschüssiger Octansäure bedeckt. Diese Schicht wurde mit Hilfe einer Kapillare abgesaugt, die feste Phase wurde durch zweimalige Filtration über Glaswolle abgetrennt und verworfen. Das Filtrat war durch überschüssige, emulgierte Octansäure trüb.
Das Filtrat wurde durch Zutropfen von 1 molarer Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt; die emulgierte Octansäure ging dabei in Lösung, so daß die Trübung verschwand. Es wurde anschließend 3 Std. bei Raumtemperatur und 18 Std. bei 5°C gegen 0,15 molare Kochsalzlösung dialysiert.

4.2 Isolierung des Hemmkörpers

Der Hemmkörper wurde nach der von LAVERGNE entwickelten Methode isoliert (39).
Das Verfahren beruht auf,

1. einen Immunkomplex aus Faktor VIII und Hemmkörper zu bilden,
2. diesen selektiv zu fällen,
3. den gefällten und dadurch von anderen Immunglobulinen befreiten Immunkomplex wieder zu dissoziieren, um den Hemmkörper zurückzuerhalten.

Während die Immunkomplexbildung und Fällung keine Schwierigkeiten bereitete, gelang es nicht, den Immunkomplex nach der von den Autoren angegebenen Methode zu dissozieren, so daß eine Modifikation notwendig wurde.

4.2.1 Bildung und selektive Fällung des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII

Prinzip: Durch Inkubation von Faktor VIII im Überschuß mit vorbehandeltem Hemmkörperplasma oder der Immunglobulinfraktion des Hemmkörperplasmas im gepufferten Milieu wird der Immunkomplex gebildet.
Durch Zugabe von Polyäthylenglykol vom Molgewicht 6000 bis zu einer Endkonzentration von 2,5 % und Abkühlen des Ansatzes auf 0°C fällt der Immunkomplex und andere Proteine aus, während 95 % der freien Immunglobuline in Lösung bleiben (39,49). Durch Zentrifugation wird der gefällte Immunkomplex abgetrennt.
Durchführung:
Vorbehandlung des Hemmkörperplasmas: Durch die Vorbehandlung sollen Proteasen und Gerinnungsfaktoren aus dem Plasma entfernt werden. Zu 100 Volumenteilen Hemmkörperplasma wurden 7 Teile einer 25%igen Aluminiumhydroxydsuspension in physiologischer Kochsalzlösung gegeben, 10 Min. geschüttelt und 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert. Der Überstand wurde 30 Min. im Wasserbad auf 56°C erwärmt und erneut 15 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert.
Pufferlösungen:
Puffer I : HEPES 0,75 mol/l + NaCl 0,5 mol/l; pH = 7,4
Puffer II : Puffer I, 1:10 verdünnt, auf pH 7,4 eingestellt.
Polyäthylenglykollösungen:
20%ige Lösung: 20 g in Puffer II gelöst, auf 100 ml aufgefüllt
2,5%ige Lösung: die 20%ige Lösung wurde mit Puffer II entsprechend verdünnt.
Faktor-VIII-Lösung: Ein lyophilisiertes Faktor VIII-Konzentrat mit 500 E Faktor VIII wurde in 50 ml dest. Wasser gelöst und in Portionen zu je 10 ml tiefgefroren. Von einer getauten Probe wurde die Aktivität bestimmt. Vom Ausgangsmaterial wurde die Hemmkörperaktivität bestimmt.

Ansatz: Die Volumina von hemmkörperhaltigem Ausgangsmaterial und Faktor-VIII-Lösung wurden so gewählt, daß auf 4 Einheiten Hemmkörper 3 Einheiten Faktor VIII entfallen. Zu 9 Volumenteilen Ausgangsmaterial wurde 1 Volumenteil Puffer I gegeben, anschließend wurde die berechnete Menge der frisch getauten Faktor-VIII-Lösung zugesetzt und 2 Std. im Wasserbad bie 37°C inkubiert. Zum Ansatz wurde dann soviel 20%ige Polyäthylenglykollösung zugesetzt, daß die Konzentration an Polyäthylenglykol 2,5 % im Ansatz betrug. Der Ansatz wurde mit Eiswasser auf 0°C abgekühlt und 30 Min. bei dieser Temperatur stehen gelassen. Anschließend wurde 30 Min. bei 0°C und 10 000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.
Der Rückstand wurde sofort weiterverarbeitet (dissoziiert, siehe 4.2.2).
Um den Anteil unspezifisch mitgefällter Immunglobuline zu reduzieren, wurde der Rückstand jedoch zuvor in einigen Fällen mit eiskalter 2,5%iger Polyäthylenglykollösung, deren Volumen 1/10 des Ausgangsvolumens betrug, aufgeschüttelt und dann erneut 30 Min. bei 0°C und 10 000 g zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand verworfen und der Rückstand sofort weiterverarbeitet.

.2.2 Dissoziation des selektiv gefällten Immunkomplexes

Prinzip: Die Bildung und der Zerfall von Immunkomplexen erfolgen nach den Bedingungen des Massenwirkungsgesetzes. Es besteht daher ein Gleichgewicht zwischen dem freien Antikörper und dem freien Antigen einerseits und dem Immunkomplex andererseits. Wird freies Antigen durch Zerstörung dem Gleichgewicht entzogen, so wird sich die Reaktion in Richtung Dissoziation verschieben, mit dem Ziel, das alte Gleichgewicht wieder zu erreichen und mit der Folge, daß Antiköprer freigesetzt wird.
Dieser Vorgang läßt sich beschleunigen, wenn man die Bedingungen verändert, unter denen die Bindungen zwischen Antigen und Antikörper stabil sind. Zwischen Antigen und

Antikörper gibt es im Immunkomplex Wasserstoffbrückenbindungen, heteropolare (= Ionenbindungen) und apolare (= hydrophobe) Bindungen. Wasserstoffbrückenbindungen werden bei höherer Temperatur und in Gegenwart von Stoffen, die das Dipolmoment des Wassers erhöhen, instabil; heteropolare Bindungen lassen sich durch Veränderungen des pH-Wertes spalten. Den Einfluß der Temperatur und des pH-Wertes auf die Stabilität des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII haben ALLAIN und FROMMEL (50) untersucht. Obwohl der Immunkomplex aus Faktor VIII und Hemmkörper als nicht sehr stabil gilt und sich durch Ansäuern auf pH 4 oder Erhitzen auf 56°C leicht spalten lassen soll (50,39,40), gelang dies mit dem hier vorliegendem Hemmkörper nicht. Eigene Versuche (siehe S. 31 ff) führten zur Dissoziation des Immunkomplexes durch Inkubation mit Harnstofflösung, die zweierlei bewirkt:

1. Faktor VIII wird denaturiert und damit dem Gleichgewicht entzogen,
2. das Dipolmoment des Lösungsmittels wird stark erhöht und dadurch die Wasserstoffbrückenbindung destabilisiert.

Durchführung: der frisch abzentrifugierte Immunkomplex wurde in 6 molarer Harnstofflösung, die durch Auflösen des Harnstoffes in Puffer II (siehe S. 23) bereitet worden war und deren Volumen etwa 10 % des Volumens betrug, welches das hemmkörperhaltige Ausgangsmaterial vor der Herstellung des Immunkomplexes hatte, gelöst und 1 Std. im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden der Harnstoff und Reste des Polyäthylenglykols durch Dialyse gegen Puffer II über Nacht bei 4°C entfernt. Das Dialysat ist durch ausgefallenes Fibronectin, welches als Verunreinigung in der Faktor-VIII-Lösung enthalten ist und bei der Polyäthylenglykolfällung mitgefällt wurde, getrübt. Das Dialysat wurde 30 Min. in Eiswasser auf 0°C abgekühlt und dann 30 Min. bei 0°C und 6000 g zentrifugiert. Der Rückstand besteht im wesentlichen aus Fibronectin und wurde verworfen.

.2.3 Aufarbeitung des Dissoziats

Das nach 4.2.2 gewonnene Dissoziat enthält neben dem Hemmkörper nur noch Spuren anderer Immunglobuline, so daß es ohne weitere Reinigung zur Bestimmung der Leichtketten und Schwerketten des Hemmkörpers eingesetzt werden konnte. Allerdings ist es durch einige Nicht-Immunglobuline verunreinigt: Es enthält an Fremdproteinen neben denaturiertem Faktor VIII und undissoziiertem oder denaturiertem Immunkomplex noch Verunreinigungen, die aus der verwendeten Faktor-VIII-Lösung stammen, insbesondere Fibronectin und etwas Albumin.
Durch folgende Methoden wurde der Anteil der Fremdproteine verringert:
1. Das Dialysat wurde durch eine Gelfiltration gereinigt.
Prinzip: Die Probe wird über ein Gel filtriert, dessen Maschenweite so bememssen ist, daß es kleinen Molekülen den Zutritt zur Gelmatrix gestattet, mit steigender Molekülgröße jedoch zunehmend erschwert. Dadurch ist der Verteilungsraum für kleine Moleküle groß und wird um so kleiner, je größer das Molekül ist. Bei der Elution erscheinen die großen Moleküle daher vor den kleinen; das Proteingemisch wird nach dem Molgewicht aufgetrennt.
Durchführung: Sepharose 6 B Cl wurde mit Puffer II (siehe S. 23) gewaschen und mit diesem Puffer äquilibriert. In einer Glassäule von 1 m Länge und 16 mm Durchmesser wurde eine Aufschwemmung des Gel gebracht und dort sedimentieren lassen. Der überstehende Puffer wurde abgepumpt, bis der Flüssigkeitsspiegel etwa 5 mm über dem Gel stand. Anschliessend wurde das Dialysat auf die Säule gebracht und diese mit einem Stempel verschlossen, der über einen Schlauch mit einem Vorratsgefäß verbunden war, welches den Puffer enthielt. Es wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/Min. eluiert. Der Proteingehalt wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm in einem Durchlaufphotometer kontinuierlich registriert. Das Eluat wurde in Portionen von je 5 ml in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die hemmkörperhaltigen Frak-

tionen wurden identifiziert, indem von jeder Fraktion 0,1 ml mit 0,1 ml Faktor-VIII-Lösung 2 Std. bei 37°C inkubiert wurde und dann die Restaktivitäten bestimmt wurden. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch eine Druckdialyse auf das ursprüngliche Volumen eingeengt.

2. Das Dialysat wurde gereinigt, indem die Fremdproteine an einen Ionenaustauscher gebunden wurde.

Prinzip (51): Bei einem pH-Wert von 6,6 weisen Immunglobuline eine positive Bruttoladung auf, während die meisten anderen Proteine negativ geladen sind. Ein Anionenaustauscher besitzt positiv geladene Gruppen, die in einem hochmolekularen, wasserunlöslichen Netzwerk verankert sind und durch entgegengesetzt geladene Ionen des umgebenden Puffers neutralisiert werden. Bringt man einen solchen Ionenaustauscher in die Proteinlösung, so werden negativ geladene Proteine die Gegenionen im Puffer ersetzen, sie werden gegen die Pufferionen ausgetauscht und an den Ionenaustauscher gebunden. Dieser Vorgang läuft nicht stöchiometrisch ab, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem negativ geladene Proteine mit negativ geladenen Pufferionen um die Ankergruppen des Ionenaustauschers konkurrieren; deshalb muß die Ionenstärke des Puffers möglichst niedrig gewählt werden, so daß sich das Gleichgewicht möglichst weit in Richtung Proteinbildung einstellt.

Durchführung: Um eine starke Verdünnung des Produktes mit ihren Nachteilen (siehe S. 37) zu vermeiden, wurde der Ionenaustausch nicht als Chromatographie, sondern als einfacher Absorbtionsschritt durchgeführt.

Pufferlösung: Es wurde soviel einer 0,02 molaren Na_2HPO_4-Lösung in eine 0,02 molare NaH_2PO_4-Lösung unter Rühren gegeben, daß sich ein pH-Wert von 6,6 ergab.

Vorbereitung des Ionenaustauschers: 10 ml DEAE-Biogel A wurden 15 Min. in 50 ml 0,01 molarer Natronlauge gerührt, auf einer Glasfritte wurde das Gel abfiltriert und mit dest. Wasser bis zu neutraler Reaktion des Filtrates gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit 0,02 molarem Phosphatpuffer gewaschen, bis das Filtrat einen pH-Wert

von 6,6 hatte.
Ionenaustausch: 1 ml des Dissoziates wurden 24 Std. gegen den 0,02 molaren Phosphatpuffer dialysiert. Der Puffer wurde dabei mehrfach erneuert. Das Dialysat hatte am Ende eine pH-Wert von 6,6.
Das Dialysat wurde mit 0,5 ml des fast trockenen Ionenaustauschergels versetzt und 30 Min. geschüttelt. Auf einer kleinen Säule wurde abfiltriert. Der Ionenaustauscher wurde mit je 2 ml Phosphatpuffer 2 mal eluiert. Schließlich wurden die gebundenen Proteine mit 2 ml einer phys. Kochsalzlösung, die mit Natronlauge auf pH 9 eingestellt worden war, freigesetzt. Alle Filtrate bzw. Eluate wurden getrennt aufgefangen und auf ihren Hemmkörpergehalt getestet.

5 ERGEBNISSE

5.1 Ausbeute und Reinheit nach Isolierung der Immunglobulinfraktion aus Hemmkörperplasma

Aus zwei Hemmkörperplasmen wurde nach der unter 4.1 beschriebenen Methode die Immunglobulinfraktion isoliert. Im ersten Fall wurde das Produkt durch eine Druckdialyse weiter konzentriert.
Zur Beurteilung der Effektivität dieses Reinigungsschrittes wurden von den Hemmkörperplasmen und den aus ihnen gewonnenen Produkten die Hemmkörperaktivitäten, die Proteingehalte sowie die Gehalte an Immunglobulinen bestimmt; aus diesen Werten wurden die Ausbeuten an Hemmkörper und an Immunglobulinen errechnet; ferner wurde die Hemmkörperaktivität pro mg IgG bzw. pro mg Protein für die Hemmkörperplasmen und die gewonnenen Produkte berechnet und die Anreicherung des Hemmkörpers, bezogen auf den IgG-Gehalt bzw. bezogen auf den Proteingehalt, ermittelt.
Die Einzelheiten sind in Tab. 1 zusammengefaßt.
Auffällig ist die gute Übereinstimmung der Ausbeute von IgG und Hemmkörper, die auch im Anreicherungsfaktor von ca. 1 des Hemmkörpers bezogen auf IgG zum Ausdruck kommt, während die Ausbeuten an IgA und IgM, die im ersten Fall ermittelt wurden, stark von der des Hemmkörpers abwichen: ein Hinweis darauf, daß der Hemmkörper der Klasse IgG angehört.
Die im ersten Fall durchgeführte Druckdialyse führte zwar zum Anstieg der IgG-Konzentration auf etwa den zu erwartenden Wert, jedoch ging offenbar dabei ein erheblicher Anteil der Hemmkörperativität verloren, wodurch die Ausbeute an Hemmkörper auf 47,83 % und die Anreicherung, bezogen auf IgG, auf 0,77 gesenkt wurde. Aus diesem Grund wurde im zweiten Fall das Produkt nicht weiter konzentriert.

Tab. 1 Isolierung der Immunglobulinfraktionen

Ausgangsmaterial	Fall I		Fall II
Volumen	230 ml		220 ml
Hemmkörperaktivität	4 E/ml		4 E/ml
IgG	6,85 mg/ml		7,85 mg/ml
IgA	1,54 mg/ml		1,72 mg/ml
IgM	0,78 mg/ml		0,9 mg/ml
Protein	64,1 mg/ml		64,7 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	0,584		0,509
E Hemmk/mg Prot.	0,0624		0,0618
Produkt		nach Konzentration d. Druckdialyse	
Volumen	220 ml	110 ml	260 ml
Hemmkörperaktivität	2,9 E/ml	4 E/ml	2,3 E/ml
IgG	4,75 mg/ml	8,9 mg/ml	4,25 mg/ml
IgA	0,66 mg/ml		
IgM	0,2 mg/ml		
Protein	8,5 mg/ml	16,76 mg/ml	7,53 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	0,611	0,449	0,541
E Hemmk/mg Prot.	0,341	0,239	0,305
Ausbeute in % d. Theorie			
Hemmkörper	69,35 %	47,83 %	67,95 %
IgG	66,3 %	62,1 %	64,0 %
IgA	41 %		
IgM	24,6 %		
Anreicherung des Hemmkörpers			
bezogen auf IgG	1,05	0,77	1,06
bezogen auf Protein	5,46	3,83	4,94

5.2 Optimale Bedingungen zur Dissoziation des Immunkomplexes

Zunächst wurde versucht, den Immunkomplex nach der von LAVERGNE (39) beschriebenen Methode durch Erwärmen auf 56°C zu spalten. Dazu wurde der gefällte Immunkomplex in Puffer II (siehe S. 23) gelöst, wobei ein Volumen von 1/10 des Ansatzes vor der Fällung gewählt wurde und 2 Std. bei Raumtemperatur sowie 18 Std. bei 4°C gegen diesen Puffer dialysiert, um das Polyäthylenglykol zu entfernen. Es fiel auf, daß sich das gefällte Material nur schwer löste und die Lösung trüb blieb. Die Lösung wurde nach der Dialyse 30 Min. auf 56°C erwärmt und anschließend 30 Min. bei 15°C und 8000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt keine Hemmkörperaktivität. Dieser Versuch wurde mehrfach mit gleichem Ergebnis wiederholt.
Die Bedingungen, unter denen dissoziiert wurde, wurden nun variiert. Um ein identisches Ausgangsmaterial für die Versuche zur Dissoziation zu haben, wurde ein Immunkomplex aus 20 ml Hemmkörperplasma mit einer Hemmkörperaktivität von 2,8 E/ml (das sind insgesamt 56 E Hemmkörper) nach 4.2.1 hergestellt. Das Volumen des Ansatzes betrug nach der Zugabe von Polyäthylenglykol 32,05 ml. Dieser Ansatz wurde in Portionen zu je 5 ml zentrifugiert. Der Rückstand jeder dieser Portionen enthielt somit die gleiche Menge an Immunkomplex, nämlich die Menge, die aus 8,74 Einheiten Hemmkörper unter den gegebenen Bedingungen entsteht.
Die Rückstände wurden nun wie folgt weiterverarbeitet:

1. in 1 ml Puffer II gelöst, 30 Min. auf 56°C erhitzt; Endvolumen = 0,93 ml
2. in 1 ml 6 molarer Harnstofflösung in Puffer II gelöst, 30 Min. auf 56°C erhitzt, über Nacht gegen Puffer II dialysiert; Endvolumen = 1,03 ml
3. in 1 ml Harnstofflösung wie unter 2. gelöst, 90 Min. bei 37°C inkubiert, über Nacht gegen Puffer II dialysiert; Endvolumen = 0,97 ml
4. in 1 ml Harnstofflösung wie unter 2. gelöst, mit Salzsäure auf pH 4,2 eingestellt, 30 Min. bei 37°C

inkubiert, mit Natronlauge auf pH 7,6 gebracht, über Nacht gegen Puffer II dialysiert; Endvolumen = 1,08 ml

5. in 1 ml Salzsäure, die auf pH 4,2 verdünnt worden war, gelöst, der pH-Wert stieg dabei auf 7 und wurde durch Zugabe von Salzsäure wieder auf 4,2 gebracht, es wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert, mit Natronlauge auf pH 7,6 eingestellt und über Nach gegen Puffer II dialysiert. Endvolumen = 1,07 ml.

Alle Ansätze wurden 10 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert, die Hemmkörperaktivität der Überstände wurde bestimmt, die in den einzelnen Proben enthaltene Hemmkörpermenge wurde aus den gefundenen Hemmkörperaktivitäten und den jeweiligen Endvolumina errechnet und daraus die Ausbeuten ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2 Ausbeute an Hemmkörper bei unterschiedlicher Dissoziationsbedingungen des gefällten Immunkomplexes

Dissoziation durch	Endvol.	Hemmkörper Aktivität	Menge	Ausbeute (8,74 ≙ 100 %)
Erwärmen 30 Min. 56°C	0,93 ml	0 E/ml	0 E	0 %
6 M Harnstoff 30 Min. 56°C	1,03 ml	1,1 E/ml	1,13 E	12,9 %
6 M Harnstoff 90 Min. 37°C	0,97 ml	1,7 E/ml	1,65 E	18,9 %
6 M Harnstoff 30 Min. pH 4,2	1,08 ml	1,3 E/ml	1,4 E	16,0 %
HCL 30 Min. pH 4,2	1,07 ml	0 E/ml	0 E	0 %

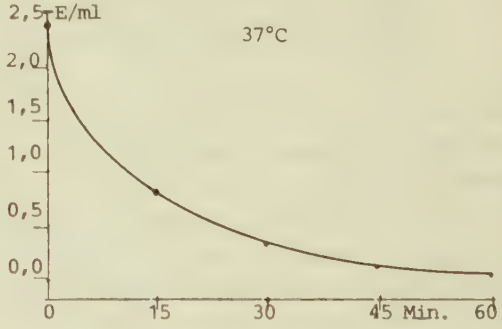
Es zeigte sich, daß alle Ansätze, die Harnstoff enthielten, den Immunkomplex dissoziierten und daß es nicht erforderlich ist, erhöhte Temperatur oder extreme pH-Werte zur Dissoziation des Immunkomplexes anzuwenden.

Es galt nun, die Inkubationszeit zu ermitteln, bei der die beste Ausbeute an Hemmkörper auftritt, wenn man den gefällten Immunkomplex in 6 molarer Harnstofflösung bei 37°C inkubiert. Eine Voraussetzung zur Dissoziation des Immunkomplexes ist, daß Faktor VIII durch Inaktivierung aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Deshalb wurde zunächst die Inaktivierung von Faktor VIII durch Harnstoff verfolgt. Dazu wurde 1 ml einer Faktor-VIII-Lösung mit einer Aktivität von 4,8 E/ml mit 1 ml einer 6 molaren Harnstofflösung in Puffer II (siehe S. 23) bei 37°C inkubiert. Nach je 15 Min. wurde eine Probe entnommen, verdünnt und die Faktor-VIII-Aktivität bestimmt. Die gefundenen Werte zeigt Tab. 3; Abb. 1 zeigt die Faktor-VIII-Aktivität gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

Tab. 3 Inaktivierung von Faktor VIII in Harnstoff (3 mol/l) bei 37°C

Inkubationszeit	Restaktivität
0 Min.	2,4 E/ml
15 Min.	0,8 E/ml
30 Min.	0,4 E/ml
45 Min.	0,2 E/ml
60 Min.	0,08 E/ml

Abb. 1 Inaktivierung von Faktor VIII in Harnstoff (3 mol/l) bei 37°C



Man erkennt, daß die Faktor-VIII-Aktivität exponentiell abnimmt. Nach einer Stunde ist Faktor VIII nahezu vollständig inaktiviert.

Zur Beurteilung des Einflusses der Inkubationszeit auf die Ausbeute an Hemmkörper wurde der Immunkomplex aus 10 ml Hemmkörperplasma mit einer Hemmkörperaktivität von 4 E/ml nach 4.2.1 gefällt. Der gefällte Immunkomplex wurde in 3 ml der 6 molaren Harnstofflösung in Puffer II gelöst und bei 37°C inkubiert. Nach je einer Stunde wurde eine Probe von 0,7 ml entnommen, die letzte Probe hatte ein Volumen von 0,67 ml. Alle Proben wurden sofort gegen kalten

Puffer dialysiert. Die Volumina der Proben nach der Dialyse wurden bestimmt, die Proben wurden 10 Min. bei 3000 Upm. zentrifugiert und von den Überständen wurden die Hemmkörperaktivitäten bestimmt. Unter Berücksichtigung der Volumina vor und nach der Dialyse wurden die Ausbeuten berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tab. 4 Einfluß der Inkubationszeit bei der Dissoziation des Immunkomplexes mit 6 molarer Harnstofflösung bei 37°C

Inkubationszeit (Std.)	Endvol.	Hemmkörper-aktivität	-menge	Ausbeute
1	0,73 ml	3,0 E/ml	2,19 E	23,55 % (9,3 E ≙ 100 %)
2	0,64 ml	3,1 E/ml	1,98 E	21,29 % (9,3 E ≙ 100 %)
3	0,71 ml	2,9 E/ml	2,06 E	22,15 % (9,3 E ≙ 100 %)
4	0,54 ml	2,4 E/ml	1,30 E	14,6 % (8,9 E ≙ 100 %)

(Anm.: Das Vol. der Probe 4 betrug vor der Dialyse 0,67 ml, alle anderen Proben hatten vor der Dialyse ein Vol. von 0,7 ml; deswegen entsprächen 8,9 E Hemmkörper bei Probe 4 100 % Ausbeute, während bei den übrigen Proben 9,3 E Hemmkörper 100 % Ausbeute entsprächen.)

Offenbar wird die Ausbeute durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf über eine Stunde nicht verbessert; bei einer Ausdehnung auf 4 Std. geht sie sogar deutlich zurück. Andererseits erscheint eine kürzere Zeit als eine Stunde nicht sinnvoll, da sonst der Faktor VIII nicht ausreichend inaktiviert wird. Deshalb wurde die günstigste Inkubationszeit für die Dissoziation des gefällten Immunkomplexes durch Inkubation mit 6 molarer Harnstofflösung mit einer Stunde angenommen.

Ausbeute und Reinheit des Hemmkörpers nach selektiver Fällung des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII, Dissoziation des Immunkomplexes durch Inkubation mit Harnstoff.

Nachdem die Bedingungen zur Dissoziation des Immunkomplexes bekannt waren, wurden in drei Ansätzen größere Mengen des Hemmkörpers mit der unter 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen

Tab. 5 Isolierung des Hemmkörpers durch selektive Fällung des Immunkomplexes aus Hemmkörper und Faktor VIII und Dissoziation des Immunkomplexes mit Harnstoff

Ausgangsmaterial	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Volumen	50 ml	44 ml	110 ml
Hemmkörperaktivität	4 E/ml	4 E/ml	2,3 E/ml
IgG	8,9 mg/ml	8,9 mg/ml	4,25 mg/ml
Protein	16,76 mg/ml	16,76 mg/ml	7,52 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	0,449	0,449	0,541
E Hemmk/mg Prot.	0,239	0,239	0,305
Produkt			
Volumen	5,6 ml	4,7 ml	5,6 ml
Hemmkörperaktivität	7,8 E/ml	4,2 E/ml	3,9 E/ml
IgG	0,8 mg/ml	0,35 mg/ml	0,6 mg/ml
Protein	7,9 mg/ml	7,5 mg/ml	7,44 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	9,75	12	6,5
E Hemmk/mg Prot.	0,98	0,56	0,52
Ausbeute in % d. Theorie			
Hemmkörper	21,8 %	11,2 %	8,6 %
Anreicherung des Hemmkörpers			
bezogen auf IgG	21,7	26,7	12
bezogen auf Protein	4,1	2,3	1,7

Methode isoliert. Als Ausgangsmaterial wurden die aus Hemmkörperplasma gewonnenen Immunglobulinfraktionen verwendet.
In den Ansätzen 2 und 3 wurde der gefällte Immunkomplex zur Verringerung des Anteils an unspezifisch mitgefällten Immunglobulinen vor der Dissoziation mit polyäthylenglykolhaltigem Puffer gewaschen, wie auf S. 24 beschrieben.
Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden von den Produkten die Hemmkörperaktivitäten, Proteingehalte und die Gehalte an IgG bestimmt und die Hemmkörperaktivitäten/mg Protein bzw. pro mg IgG errechnet. Die entsprechenden Daten der Ausgangsmaterialien waren schon bekannt (siehe Tab. 1) und wurden zur Berechnung der Ausbeuten und der Anreicherungsfaktoren des Hemmkörpers, bezogen auf IgG bzw. bezogen auf Proteingehalt mit herangezogen. Diese Daten sind in Tab. 5 zusammengestellt.

3.1 Einfluß des Waschens des gefällten Immunkomplexes mit polyäthylenglykolhaltigem Puffer auf Ausbeute und Reinheit

Vergleicht man die Daten der Dissoziate von Ansatz 1 und 2, die ja aus dem gleichen Ausgangsmaterial hergestellt wurden, so erkennt man den Einfluß, den das Waschen des gefällten Immunkomplexes mit polyäthylenglykolhaltigem Puffer hat: der Anteil an unspezifisch mitgefällten Immunglobulinen geht zurück, was sich im Quotienten von 12 E Hemmkörper pro mg IgG im Ansatz 2 gegenüber 9,75 im Ansatz 1 zeigt und im Anreicherungsfaktor des Hemmkörpers bezogen auf IgG von 26,7 im Ansatz 2 gegenüber 21,7 im Ansatz 1.
Der Gewinn an Reinheit des Hemmkörpers von anderen Immunglobulinen wird allerdings mit einem Rückgang der Ausbeute von 21,8 % im Ansatz 1 auf 11,2 % im Ansatz 2 erkauft.
Bemerkenswert ist ferner, daß der Anteil an Fremdproteinen, die nicht IgG sind, durch das Waschen nicht verringert wird; so liegen die Gesamtproteingehalte beider Ansätze mit 7,9 mg/ml in Ansatz 1 und 7,5 mg/ml in Ansatz 2 in der glei-

chen Größenordnung. Wegen des Rückganges der Ausbeute an Hemmkörper bei gleichbleibendem Gehalt an Nicht-IgG-Fremdproteinen geht die Anreicherung des Hemmkörpers, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, von 4,1 im Ansatz 1 auf 2,3 im Ansatz 2 zurück; ebenso sinkt der Quotient von E Hemmkörper/mg Protein von 0,98 im Ansatz 1 auf 0,56 im Ansatz 2 ab.

5.4 Reinigung des Dissoziates durch Gelfiltration

Das Dissoziat von Ansatz 1 wurde durch eine Gelfiltration weiter gereinigt. Die Daten dieses Reinigungsschrittes sind in Tab. 6 zusammengefaßt.
Bei der Gelfiltration kommt es zu einer Verdünnung der Probe; so hatten die hemmkörperhaltigen Fraktionen ein Gesamtvolumen von 22,8 ml bei 5,6 ml eingesetztem Dissoziat. Die Hemmkörperaktivität der vereinigten hemmkörperhaltigen Fraktionen lag unter 1 E/ml und konnte daher nicht exakt bestimmt werden. Die vereinigten Fraktionen wurden deshalb durch eine Druckdialyse auf ein Volumen von 5,9 ml eingeengt. Offenbar ist dabei ein erheblicher Anteil an Hemmkörper inaktiviert worden, denn die Hemmkörperaktivität der eingeengten Probe lag bei nur 1 E/ml, und der Quotient

Tab. 6 Gelfiltration des Dissoziates

	Ausgangsmaterial	Produkt
Volumen	5,6 ml	5,9 ml
Hemmkörperaktivität	7,8 E/ml	1 E/ml
IgG	0,8 mg/ml	0,2 mg/ml
Protein	7,9 mg/ml	0,22 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	9,75	5
E Hemmk/mg Prot.	0,98	4,55
Ausbeute		13,5 %
Anreicherung, bezogen auf IgG-Gehalt		0,51
Anreicherung, bezogen auf Proteingehalt		4,64

Aus E Hemmkörper/mg IgG war von 9,75 des eingesetzten Dissoziats auf 5 der gewonnenen Probe abgesunken. Die Erfahrung, daß der Hemmkörper eine Druckdialyse schlecht verträgt, wurde auch schon beim Versuch gemacht, die aus Hemmkörperplasma gewonnene Immunglobulinfraktion zu konzentrieren.
Obwohl es durch die Gelfiltration gut gelingt, die Fremdproteine aus dem Dissoziat zu entfernen, was sich auch im hohen Quotienten von 4,55 E Hemmkörper/mg Protein zeigt, wurde wegen der schlechten Ausbeute und der geringen erzielbaren Konzentration des Hemmkörpers ein alternativer Weg gesucht, das Dissoziat zu reinigen, bei dem eine starke Verdünnung der Probe und die Notwendigkeit, sie wieder aufkonzentrieren zu müssen, vermieden wird.

5.5 Reinigung des Dissoziats durch Binden der Fremdproteine an Ionenaustauscher

1 ml des Dissoziates von Ansatz 2 wurden mit der auf S. 27 beschriebenen Methode gereinigt.
Der Hauptanteil des Hemmkörpers fand sich im Filtrat des Gemisches aus Ionenaustauschergel und Dialysat. Die Daten in Tab. 7 beziehen sich auf dieses Filtrat.

Tab. 7 Reinigung des Dissoziates durch Ionenaustascher

	Ausgangsmaterial	Produkt
Volumen	1 ml	1 ml
Hemmkörperaktivität	4,2 E/ml	2,4 E/ml
IgG	0,35 mg/ml	0,2 mg/ml
Protein	7,5 mg/ml	1,12 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	12	12
E Hemmk/mg Prot.	0,56	2,14
Ausbeute		57,1 %
Anreicherung, bezogen auf IgG-Gehalt		1,0 %
Anreicherung, bezogen auf Proteingehalt		3,8 %

Die Eluate des Ionenaustauschergels enthielten nur Spuren oder keinen Hemmkörper und wurden verworfen.
Vergleicht man die Daten des Produktes mit denen des eingesetzten Dissoziates, so erkennt man, daß sich an der Relation von Hemmkörperaktivität zu IgG-Gehalt nichts ändert, während der Quotient aus Hemmkörperaktivität und Proteingehalt von 0,56 im Dissoziat auf 2,14 im Produkt ansteigt: der Hemmkörper wird gegenüber dem Gesamtprotein 3,8fach angereichert.
Die Abnahme der Hemmkörperaktivität von 4,2 auf 2,4 E/ml erklärt sich aus der Verdünnung der Probe mit dem in der Gelmatrix des Ionenaustauschers eingeschlossenen Puffer und durch den mechanisch im Gel festgehaltenen Anteil des Hemmkörpers, der dann im ersten Eluat erscheint. Dieser Anteil ist es auch, der in der Ausbeute an 100 % fehlt.

5.6 Synopsis der Isolierung des Hemmkörpers

Um die Leistungsfähigkeit der verwendeten Methode, den Hemmkörper zu isolieren, zu beschreiben, seien hier die Daten des urpsprünglichen Hemmkörperplasmas denen des durch Binden der Fremdproteine am Ionenaustauscher aufgearbeiteten Dissoziates gegenübergestellt:

Tab. 8 Isolierung des Hemmkörpers aus Hemmkörperplasma

	Hemmkörperplasma	Produkt
Hemmkörperaktivität	4 E/ml	2,4 E/ml
IgG	6,85 mg/ml	0,2 mg/ml
Protein	64,1 mg/ml	1,12 mg/ml
E Hemmk/mg IgG	0,584	12
E Hemmk/mg Prot.	0,0624	2,14
Anreicherung des Hemmkörpers gegenüber IgG		20,5fach
Anreicherung des Hemmkörpers gegenüber Protein		34,3fach

Insgesamt ist der Hemmkörper gegenüber den Immunglobulinen um den Faktor 20,5 und gegenüber dem gesamten Proteinbestand um den Faktor 34,3 angereichert worden. Mit 2,4 E/ml hat das gewonnene Produkt eine für weitere Untersuchungen ausreichende Hemmkörperaktivität.

5.7 Klassen- und Subklassenzugehörigkeit des Hemmkörpers

Zur Ermittlung der im Hemmkörper enthaltenen Leicht- und Schwerketten wurde das im Ansatz 3 (siehe S. 35) gewonnene Produkt nach der unter 3.5 beschriebenen Methode untersucht. In Tab. 9 sind die zum Blindwert jeder Ansatzreihe relativen (wegen der durch die Antiseren hervorgerufenen scheinbaren Aktivitätssteigerung des Faktors VIII, siehe S. 20) Restaktivitäten des Faktors VIII nach Inkubation der Hemmkörperverdünnungen mit den Antiseren, Entfernung des Präzipitats und erneuter Inkubation mit Faktor VIII, dem zur Entfernung überschüssiger Valenzen der Antiseren Immunglobuline zugesetzt worden war, aufgeführt. In den Abb. 2 und 3 sind diese relativen Restaktivitäten gegen die Verdünnungsstufen des Hemmkörpers aufgetragen.
Der Hemmkörper enthält dann die mit dem Antiserum reagierende Kette, wenn die Restaktivitäten der Ansatzreihe gegenüber der mit Puffer anstelle des Antiserums angesetzten Reihe erhöht sind.
Die Restaktivitäten der Ansätze mit Anti-α , Anti-μ und Anti-λ -Antiserum liegen in der Größenordnung der Reihe, bei der das Antiserum durch Puffer ersetzt war. Die Restaktivitäten der Reihe mit Anti-κ -Antiserum ist demgegenüber deutlich erhöht. Bei der Inkubation mit Anti-γ -Antiserum kam es in den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:1 zu einer besonders starken Zunahme der Restaktivität, die hier nicht nur durch die vollständige Inaktivierung des Hemmkörpers bedingt sein kann, sondern zusätzlich durch die schon erwähnte unspezifische Aktivitätssteigerung des Faktors VIII verursacht wird, die bei diesem Antiserum besonders stark auftrat und auch durch Zugabe von

Tab. 9 Relative Restaktivitäten des Faktors VIII nach Inkubation von Hemmkörperverdünnungen mit Antiseren und Inkubation der Überstände der zentrifugierten Ansätze mit Faktor VIII

Antiserum	Hemmkörperverdünnung			
	1:1 (unverdünnt)	1:2	1:4	Puffer
Anti-α	0,252	0,556	0,817	1,0
Anti-μ	0,233	0,500	0,833	1,0
Anti-γ	1,136	1,273	1,045	1,0
Anti-κ	0,625	0,875	1,042	1,0
Anti-λ	0,302	0,583	0,875	1,0
Anti-γ_1	0,270	0,620	0,960	1,0
Anti-γ_2	0,232	0,528	0,880	1,0
Anti-γ_3	0,187	0,467	0,800	1,0
Anti-γ_4	0,216	0,464	0,768	1,0
Puffer	0,226	0,524	0,780	1,0

Abb. 2 Restaktivitäten gegen Verdünnungsstufe der Ansatzreihen Anti-$\alpha, \gamma_1, \mu, \kappa, \lambda$

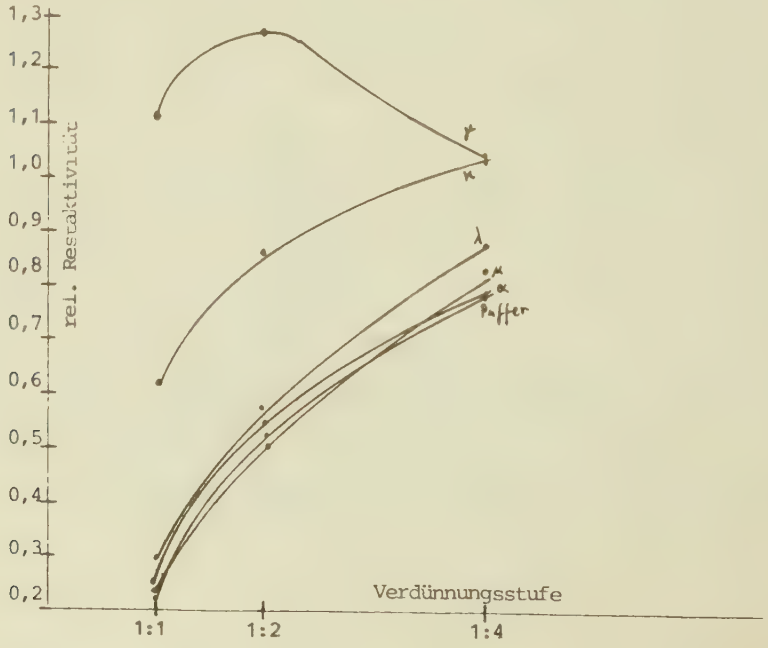
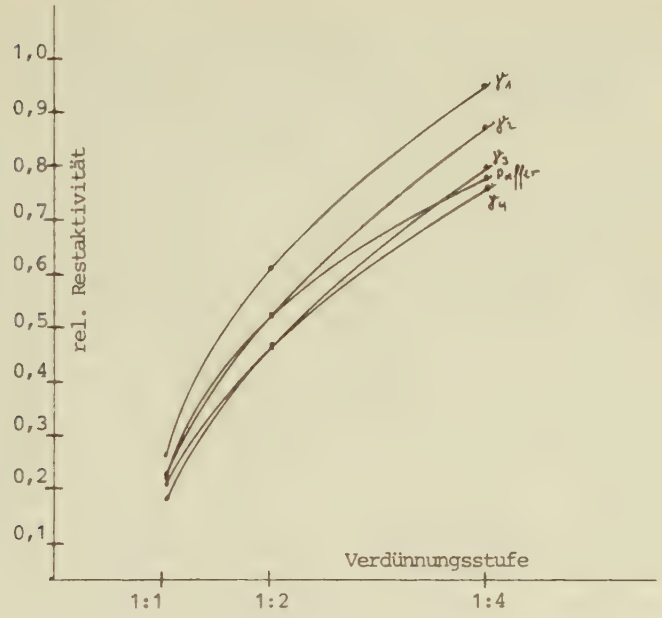


Abb. 3 Restaktivitäten gegen Verdünnungsstufen der Ansatzreihen Anti- γ1, γ2, γ3, γ4



Immunglobulinen nicht aufgehoben werden konnte. Auch die Restaktivität der Verdünnungsstufe 1:4 liegt weit über gleichen Stufe aus der Ansatzreihe mit Puffer, allerdings wirkt sich hier die unspezifische scheinbare Aktivitätszunahme des Faktors VIII nicht mehr so stark aus; offenbar kommt es nur bei einer bestimmten Relation von Immunglobulinen und Valenzen des Antiserums im Ansatz zu diesem Effekt.

Aus den Ergebnissen der Inkubationsversuche mit Hemmkörperverdünnungen und Antiseren geht hervor, daß der Hemmkörper der Klasse IgG angehört und in der Hauptsache als Leichtketten κ-Ketten enthält. Da die Restaktivitäten der Ansatzreihe mit Anti- λ -Antiserum ganz leicht über denen der Ansatzreihe mit Puffer liegt, ist nicht ganz auszuschließen, daß nicht doch auch λ -Ketten im vor-

liegenden Hemmkörper vorkommen. Jedenfalls treten sie quantitativ gegenüber den κ-Ketten weit in den Hintergrund.
Die Ergegnisse der Inkubation des Hemmkörpers mit den Antiseren gegen die Untergruppen der IgG- γ -Schwerkette ergaben erwartungsgemäß weniger starke Abweichungen gegenüber den Vergleichswerten aus den Ansätzen mit Puffer. Zum einen hatten sie eine geringere Bindungskapazität als die übrigen Antiseren, zum anderen bestehen zwischen den verschiedenen γ-Ketten-Subtypen Antigengemeinschaften, die dazu führen, daß bei entsprechendem Überschuß ein Antiserum auch Ketten bindet, gegen die es sich nicht primär richtet. Dies trifft besonders für die Verdünnungsstufe 1:4 zu. Die Restaktivitäten dieser Verdünnungsstufe liegen höher, als man nach den Werten für die Stufen 1:1 und 1:2 erwarten würde; die Kurven in Abb. 3 verlaufen deshalb steiler als die Kurve der aus Puffer ermittelten Werte.
In den Verdünnungsstufen 1:1 und 1:2 liegen lediglich die Restaktivitäten der Ansatzreihe mit γ1-Antiserum über den Werten der mit Puffer durchgeführten Vergleichsuntersuchung. In der Stufe 1:4 liefert γ2-Antiserum zwar einen erhöhten Wert, jedoch sind die Werte in den übrigen Verdünnungsstufen mit denen des Puffers nahezu identisch, so daß angenommen werden kann, daß der erhöhte Wert nicht durch eine spezifische Reaktion des Antiserums mit dem Hemmkörper zustande gekommen ist, sondern durch Antigengemeinschaft der γ1- mit der γ2-Kette das Antiserum den Hemmkörper unspezifisch gebunden hat. Die beiden übrigen Antiseren lieferten in keiner Verdünnungsstufe erhöhte Werte.
Nach den vorliegenden Untersuchungen kann man zusammenfassend sagen, daß im vorliegenden Hemmkörper hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich, γ1-Schwerketten und κ-Leichtketten vorhanden sind.

6 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine Isolierungsmethode für Hemmkörper aus Plasmen mit niedriger Hemmkörperaktivität auszuarbeiten, um ihn für die Untersuchung der in ihm enthaltenen Leicht- und Schwerketten zugänglich zu machen.
Die Isolierung gelang durch eine Modifikation der Methode von LARVERGNE (39), bei der zunächst der Immunkomplex aus Hemmkörper und Faktor VIII gebildet und nach selektiver Fällung aus Polyäthylenglykol dissoziiert wird, wobei der Hemmkörper zurückgewonnen wird. Die Modifikation besteht in der Methode, den Immunkomplex zu dissoziieren; LAVERGNE (39) spaltet den Immunkomplex durch Erwärmen auf 56°C, während dies mit dem hier vorliegenden Hemmkörper nicht gelang, aber durch Inkubation des Immunkomplexes mit 6 molarer Harnstofflösung erreicht werden konnte. Nach der Reinigung des Dissoziates war der Hemmkörper gegenüber den Immunglobulinen 20fach, gegenüber allen Proteinen 34fach angereichert.
Bei Versuchen, den Immunkomplex zu dissoziieren, zeigte sich, daß der Immunkomplex nicht nur gegenüber Temperaturerhöhung, sondern auch gegenüber pH-Verschiebungen in den sauren Bereich auf 4,2 stabil war. in den wenigen Fällen, bei denen ein Hemmkörper über Immunkomplexbildung und anschließender Dissoziation isoliert worden war (39, 42), ist eine derartige Stabilität nicht beschrieben worden. Damit stellt sich die Frage, ob die beobachtete Stabilität eine Eigenschaft des hier vorliegenden Hemmkörpers ist. Es wären aber auch folgende Mechanismen denkbar, die zu einer Steigerung der Stabilität des Immunkomplexes geführt haben könnten, ohne daß diese eine Eigenschaft des Hemmkörpers wäre:
1. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Pufferung HEPES mit einem Zusatz von Kochsalz verwendet, während LAVERGNE Barbitalpuffer benutzte. Ein Einfluß des Puffers auf die Stabilität des Immunkomplexes erscheint aber nicht sehr plausibel.

2. Es fiel auf, daß der Niederschlag nach Zentrifugation der Polyäthylenglykolfällung sich in Puffer nur sehr schwer löste und die Lösung trüb blieb. Es muß deshalb erwogen werden, ob der Immunkomplex in das unlösliche Material eingeschlossen ist. Der Niederschlag enthält größere Mengen an verunreinigten Begleitproteinen, die nicht den Immunglobulinen angehören. Unter dem Einfluß des Polyäthylenglykol könnte es zu einer Änderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur dieser Proteine (oder auch des Immunkomplexes selbst) mit Freilegung reaktiver Gruppen und Bildung von schwachen Bindungen gekommen sein, die die Löslichkeit in Puffer herabsetzen, während diese Bindungen durch Harnstoff wieder gespalten werden, so daß der Niederschlag in Harnstofflösung löslich ist. Die Harnstofflösung würde in diesem Fall also nicht nur die Bindung zwischen Hemmkörper und Faktor VIII, sondern vor allem die durch Denaturierung entstandenen zusätzlichen Bindungen im Niederschlag dissoziieren. Gegen die Annahme, der Immunkomplex sei durch solche unspezifische Bindungen im Niederschlag fixiert, spricht die Tatsache, daß die Ausbeute durch das Waschen des Niederschlages so stark zurückgeht; hierbei wird deutlich, wie leicht der Immunkomplex aus dem Niederschlag ausgewaschen wird.
Es scheint also, daß die beobachtete Stabilität des Immunkomplexes eine Eigenschaft des hier vorliegenden Hemmkörpers ist. Untersuchungen von ALLAIN und FROMMEL (50) haben ebenfalls ergeben, daß es Hemmkörper mit dieser Eigenschaft gibt. Diese Autoren haben die Stabilität von Immunkomplexen aus Hemmkörper und Faktor VIII anhand der durch Ansäuern oder Erwärmen auf 56°C zurückzugewinnenden Anteile des Hemmkörpers bestimmt. Bei Patienten, die lange Zeit nicht mit Faktor VIII behandelt worden waren, sich also im steady state befanden, ließen sich die Immunkomplexe mit Ausbeuten an Hemmkörper bis zu 66 % spalten. Nach frischer Exposition mit Faktor VIII kam es dann aber nicht nur zum Titeranstieg des Hemmkörpers, sondern gleichzeitig ging der Anteil an wiedergewonnenem Hemmkörper zurück, die Stabilität der Immunkomplexe nahm also zu. In zwei

Tab. 10 Zusammensetzung von Hemmkörpern bei Patienten mit primärer Hämophilie

Hemmkörper aktivität in E/ml	Definition: 1 E Hemmk. neutralisiert n Einheiten Faktor VIII	Ketten + = nachgewiesen - = ausgeschlossen ? = nicht bestimmt						Autor Jahr Literaturangabe
		κ	λ	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	
4		-	?	?	?	?	+	ROBBOY 1970 (38)
13,5	n = 0,75	+	-	-	-	+	+	LAVERGNE
8		+	-	-	-	+	+	1976
15		+	-	-	-	+	+	(39)
830	n = 0,5	+	-	+	?	-	+	
10400		+	-	+	?	-	+	HULTIN
400		+	-	+	?	-	+	1974
280		+	-	+	?	-	+	(40)
320		+	(+)	+	?	-	+	
100	n = 0,75	+	-	-	-	-	+	
180		+	-	-	-	-	+	
305		+	-	-	-	-	+	ALLAIN
36		+	-	-	-	-	+	1981
40		+	+	-	-	-	+	(41)
765		+	-	-	-	-	+	
160		+	-	-	-	-	+	
198		+	-	-	-	-	+	
280		+	-	-	-	-	+	
4	n = 0,5	+	-	+	-	-	-	eigenes Ergebnis

Fällen ging die Ausbeute an dissoziierbarem Hemmkörper im Verlauf einer Substitutionsbehandlung mit Faktor VIII auf 0 % zurück, der Immunkomplex war durch Erwärmen oder Ansäuern nicht mehr zu dissoziieren. Die Zunahme der Stabilität der Immunkomplexe nach Kontakt mit Faktor VIII wurde so erklärt, daß im steady state mehrere Clone Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität gegenüber Faktor VIII synthetisieren und abhängig von

Tab. 11 Zusammensetzung von Hemmkörpern bei Patienten ohne primäre Hämophilie

Ätiologie	Hemmkörperaktivität in E/ml, Definition: 1 E Hemmk. neutralis. n Einh. Faktor VIII	Ketten + = nachgewiesen - = ausgeschlossen ? = nicht bestimmt						Autor Jahr Literaturen-gabe
		κ	λ	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	
spontan	12	(+)	+	(+)	-	-	+	
postpart.	140	+	+	-	-	+	-	ROBBOY
LE	11	(+)	+	+	-	+	+	1970
LE	48	+	-	-	-	+	+	(38)
spontan	240 n = 0,5	+	-	+	-	-	+	HULTIN 1977
Epilepsie								(40)
Ampicillin	90	+	+	?	?	?	?	
ess. Hypert.	516 n = 0,75	+	+	+	-	-	+	
LE	810	+	+	+	-	-	+	
LE	408	+	+	+	-	-	+	ALLAIN
LE	290	+	-	-	-	-	+	1981
LE	92	+	-	+	-	-	+	(41)
LE	1200	+	-	+	-	-	+	
gastr.-								
intest. Ca	8	+	-	-	-	-	+	
Colon-Ca	96	+	+	?	?	-	+	
rh. Poly-								
arthritis	15	-	+	-	-	-	+	

LE = Lupus erythematodes

den Bedingungen der Restimulation vorzugsweise der Clon mit der höchsten Affinität das Antigen bindet, proliferiert und so zur Synthese und Sekretion eines einzigen Typs von Antikörpern mit hoher Affinität führt.
Nach dieser Hypothese sollte es eigentlich während der Selektierung von Immunglobulinen mit hoher Affinität zum Antigen auch zu Veränderungen im Spektrum der im Hemmkörper vorkommenden Leicht- und Schwerketten kommen, es sei denn, daß sowohl die Immunglobuline mit der geringeren Affinität

als auch die später bevorzugt gebildeten mit der höheren Affinität alle der gleichen Subklasse angehörten; dies wäre jedoch ein Zufall. Bisher sind solche Verläufe noch nicht analysiert worden. Auch in der vorliegenden Arbeit kann nichts darüber ausgesagt werden, ob bei dem untersuchten Hemmkörper vorher ein anderes Spektrum an Leicht- und Schwerketten vorgelegen hat. Auffällig ist jedoch bei dem hier untersuchten Hemmkörper, daß er - im Gegensatz zu den übrigen bisher untersuchten Hemmkörpern bei primärer Hämophilie - keine γ_4-Schwerkette, sondern eine γ_1-Kette enthält. Übereinstimmend mit den meisten anderen bisher untersuchten Hemmkörpern bei primärer Hämophilie war als Leichtkette lediglich die κ-Kette vorhanden. Die bisher untersuchten Hemmkörper bei primärer Hämophilie sind in Tab. 10 aufgelistet, Hemmkörper gegen Faktor VIII ohne primäre Hämophilie zeigt Tab. 11.

Die von LAVERGNE (39) untersuchten Hemmkörper sind durch thermische Dissoziation des Immunkomplexes isoliert worden. Die vorliegende Untersuchung beweist, daß die Dissoziation unter diesen Bedingungen keineswegs vollständig verlaufen sein muß, sondern selektiv die Immunglobuline freigesetzt haben kann, die eine geringere Affinität zum Antigen haben. Sollten in den von diesem Autor untersuchten Hemmkörpern Immunglobuline mit höherer Affinität enthalten gewesen sein, so dürften sie bei der Isolierung verloren gegangen sein.

7 ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus der Immunglobulinfraktion eines Hemmkörperplasmas mit einer Hemmkörperaktivität von 4 E/ml wurde der Hemmkörper durch Bildung des Immunkomplexes mit Faktor VIII, selektive Fällung dieses Immunkomplexes mit Polyäthylenglykol und anschließende Dissoziation des gefällten Immunkomplexes in Harnstofflösung isoliert.
Dieses Verfahren stellt eine Modifikation der von LARVERGNE (39) entwickelten Methode dar, bei der der Immunkomplex durch halbstündiges Erwärmen auf 56°C dissoziiert wird.
2. Der Immunkomplex erwies sich als beständig gegenüber Erwärmen auf 56°C oder Ansäuern auf pH 4,2 und konnte auf diese Weise nicht dissoziiert werden.
3. Durch die gewählte Methode konnte eine Ausbeute von rund 22 % bei einer Anreicherung des Hemmkörpers von 21,7fach gegenüber den Immunglobulinen und 4,1fach gegenüber allen Proteinen erreicht werden.
4. Durch Waschen des gefällten Immunkomplexes mit polyäthylenglykolhaltigem Puffer konnte die Anreicherung des Hemmkörpers gegenüber den Immunglobulinen auf 26,7fach gesteigert werden, allerdings ging dabei die Ausbeute und die Anreicherung gegenüber dem Gesamtprotein auf rund die Hälfte zurück.
5. Durch nachfolgende Reinigung des Dissoziats von den Nicht-IgG-Begleitproteinen, die an Ionenaustauscher gebunden wurden, konnte der Hemmkörper gegenüber dem Gesamtprotein nochmal um den Faktor 3,8 angereichert werden, wobei die Ausbeute rund 57 % betrug.
Die Reinigung mittels Ionenaustauscher erwies sich einer Reinigung durch Gelfiltration überlegen, da hierbei die Ausbeute sehr schlecht war und es zu einer zu geringen Endkonzentration des Hemmkörpers kam.
6. Die Zusammensetzung des Hemmkörpers wurde bestimmt. Es fanden sich κ-Leichtketten und γ_1-Schwerketten.

LITERATURVERZEICHNIS

1 Deykin, D.
Editional: Factor VIII Inhibitors
N. Engl. J. Med. 291, 205, 1974

2 Lechner, K., E. Ludwig, H. Niessner, E. Thaler
Factor VIII inhibitor in a patient with mild hemophilia A
Haemostasis 1, 261, 1972

3 Green, D., P.T. Schnette, W.H. Wallace
Factor VIII antibodies in rheumatoid arthritis. Effect of cyclophosphamide
Arch. Int. Med. 140(9), 1232, 1980

4 Krulik, M., G. Tobelem, A.A. Audebert, et al
Circulating anticoagulants in disseminated lupus erythematosus. A propos of three cases
Ann. Med. Interne (Paris) 128(1), 57, 1977

5 Moake, J. L., C.J. Kent, L.D. Meta, L.C. Wright
Circulating IgG antibodies against factor IX and VIII in multiple sclerosis
Acta Haematol. (Basel) 55(1), 53, 1976

6 Poon, M. C., H. Saito, O.D. Ratnoff, et al
Techniques for demonstration of the specificity of circulating anticoagulants against antihemophilic factor VIII with studies of two cases possibly related to diphenylhydantoine therapy
Blood 49(3), 477, 1977

7 Klein, K. G., J.D. Perkin, F. Madaras
Studies on an aquired inhibitor of factor VIII induced by penicillin allergy
Clin. Exp. Immunol. 26(1), 155, 1976

8 Voke, J., E. Letsky
Pregnancy and antibodies to factor VIII
J. Clin. Pathol. 30(10), 928, 1977

9 Rizza, C. R., J.O.P. Edgeumbe, W.R. Pitney, J.A. Child
The treatment of patients having spontaniously occuring antibodies to antihemophilic factor VIII
Thromb. Diath. Haemorrh. 28, 120, 1972

10 Deutsch, E.
Hemmkörperhämophilie
Springer, Wien, 1950

11 Biggs, R. Bidwell, E.
A method for the study of antihemophilic globulin inhibitor with reference to six cases
Br. J. Haematol, 5, 379, 1959

12 Rizza, C. R., R. Biggs
The treatment of patients who have factor VIII antibodies
Br. J. Haematol. 24, 65, 1972

13 Allain, J. P., D. Frommel
Patterns of immune response to factor VIII in hemophilia A
Blood 47(6), 973, 1976

14 Lechner, K., H. Stych
Transfusion problems in immuncoagulopathies
Bibl. Haematol. 37, 199, 1971

15 Rubin, R., J. Niemetz, S. Estren
Use of animal AHG concentrates (factor VIII) in the treatment of life- threatening hemorrhage in patients with factor VIII antibodies
Ann. NY Acad. Sci. 240, 362, 1975

16 Cobcroft, R., G. Tamagnini, K.M. Dormandy
Serial plasmapheresis in a hemophiliac with antibodies to factor VIII
J. Clin. Pathol. 30(8), 763, 1977

17 Piller, G., W. Druml, P. Höcker, et al
Use of the cell-seperator in the treatment of factor-VIII-inhibitor hemophilia
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 82, 1654, 1976

18 Slocombe, G. W., A.C. Newland, M.P. Colvin, B.T. Colvin
The role of intensive plasma exchange in the prevention and management of hemorrhage in patients with inhibitors to factor VIII
Br. J. Haematol. 47(4), 577, 1981

19 Wensley, R. T., R.F. Stevens, A.M. Burn, I.W. Delamore
Plasma exchange and human factor VIII-concentrate in managing haemophilia A with factor VIII-inhibitors
Br. Med. J. 281(6265), 1388, 1980

20 Mayne, E. E., M. Madden, I.S. Crothers, T. Ingles
Highly purified porcine factor VIII in haemophilia A with inhibitors to factor VIII
Br. Med. J. 282(6260), 318, 1981

21 Sonoda, T., A. Solomon, S. Krauss, et al
Use of prothrombine complex concentrates in the treatment of hemophilic patients with an inhibitor of factor VIII
Blood 47(6), 983, 1976

22 Blatt, P. M., G.C. White, C.W. Millan, H.R. Roberts
Treatment of anti-factor VIII antibodies
Thromb. Haemost. 38(2), 514, 1977

23 Abidgaard, C. F., J.A. Penner, E.J. Watson-Williams
Anti-inhibitor coagulant complex (Autoplex) for treatment of factor VIII-inhibitors in hemophilia
Blood 56(6), 978, 1980

24 Hultin, M. B., S.S. Shapirer, H.S. Bowman, et al
Immunsuppressive therapy to factor VIII-inhibitors
Blood 48(1), 95, 1976

25 Ting, H. C., F. Wang, P. Por, A. Nurulhuda
Idiopathic inhibitor of factor VIII and its treatment by immunsuppression
Acta Haematol. (Basel) 64(4), 236, 1980

26 Nilsson, I. M., U. Hedner, L. Holmberg
Suppression of factor VIII-antibody by combined factor VIII and cyclophosphamide
Acta Med. Scand. 195, 64, 1974

27 Hruby, M. A., I. Schulman
Failure of combined factor VIII and cyclophosphamide to supress antibody to factor VIII in hemophilia
Blood 42, 919, 1973

28 Trobisch, H.
Isolierung und biochemische Charakterisierung des Gerinnungsfaktors VIII
Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn 1978, S. 7 ff

29 Lazarchick, J., L.W. Hoyer
The properties of immune complexes formed by human antibodies to factor VIII
J. Clin. Invest. 60(5), 1070, 1977

30 Pool, J., R. Biggs, R.G. Miller
The estimation of the number of binding sites for antibody on antigen molecules, with reference to factor VIII and its antibody
Thromb. Haemost. 35(2), 274, 1976

31 Biggs, R., D.E.G. Austen, K.W.E. Denson, et al
The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. 1. Antibodies which have second order concentration graphs
Brit. J. Haemat. 23, 125, 1972

32 Biggs, R. D.E.G. Austen, K.W.E. Denson, et al
The mode of action of antibodies which destroy factor VIII. 2. Antibodies which give complex concentration graphs
Brit. J. Haemat. 23, 137, 1972

33 Kazatchkin, M. D., Y. Sultan, E.J. Burton-Kee, J.F. Mowbray
Circulating immun complexes containing anti-factor VIII antibodies in multi-transfused patients with hemophilia A
Clin. Exp. Immunol. 39(2), 315, 1980

34 Shapiro, S. S.
The immunologic character of aquired inhibitors of antihemophilic globulin (factor VIII) and the kinetics of their interaction with factor VIII
J. Clin. Invest. 46, 147, 1967

35 Shapiro, S. S., K.S. Carroll
Aquired factor VIII antibodies: Further immunologic and electrophoretic studies
Science 16, 786, 1968

36 Feinstein, D., S.I. Rapaport, M.N.Y. Chong
Immunologic characterization of 12 factor VIII inhibitors
Blood 34, 85, 1969

37 Poon, M. C., A.C. Wine, O.D. Ratnoff, G.M. Bernier
Heterogenity of human circulating anticoagulants against antihemophilic factor (factor VIII)
Blood 46, 409, 1975

38 Robboy, S. J., E.J. Lewis, P.H. Schur, R.W. Colman
Circulating anticoagulants to factor VIII: Immunochemical studies and clinical response to factor VIII concentrates
Am. J. Med. 49, 742, 1970

39 Lavergne, J. M., D. Meyer, H. Reisner
Characterization of human anti-factor VIII antibodies purified by immuncomplex formation
Blood 48, 931, 1976

40 Hultin, M. B., F.S. London, S.S. Shapiro, W.J. Yount
Heterogenity of factor VIII antibodies: Further immunochemical and biologic studies
Blood 49, 807, 1977

41 Allain, J. P., A. Gaillandre, H. Lee
Immunochemical characterization of antibodies to factor VIII in hemophilic and nonhemophilic patients
J. Lab. Clin. Med. 97, 791, 1981

42 Lavergne, J. M., D. Meyer, J. Koutts, M. J. Larrieu
Isolation of human antibodies to factor VIII
Brit. J. Haemat. 40, 631, 1978

43 Lee, H., D. Tucker, J.P. Allain
Rapid isolation and purification of antibody to factor VIII by protein A
Thromb. Res. 14, 925, 1979

44 unveröffentlicht;
persönliche Mitteilung von Dr. rer. nat. J. Scheja, Proteinlabor des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf

45 Mancini, G., A.O. Carbonara, J.F. Heremans
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion
Immunochemistry 2, 235, 1965

46 Langdell, R.E.
Partial thromboplastin time techniques
in: N. U. Bang, K. F. Beller, E. Deutsch, E. F. Mammen (Eds.): Thrombosis and bleeding disorders - theory and methods
Academic Press, New York, 1971, pp 76

47 Penick, G. D., et al
Assay for antihemophilic factor (factor VIII)
in: N. U. Bang, K. F. Beller, E. Deutsch, E. F. Mammen (Eds.): Thrombosis and bleeding disorders - theory and methods
Academic Press, New York, 1971, pp 189

48 Fine, J. M., M. Steinbuch
A simple technique for the isolation of monoclonal IgG and IgA
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 15, 1115, 1970

49 Creighton, W. D., P.H. Lambert, A. Miescher
Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by prezipitation with polyethyleneglycol
J. Immunol. 111, 1219, 1973

50 Allain, J. P., D. Frommel
Antibodies to factor VIII. Variations in stability of antigen-antibody complexes in hemophilia A
Blood 42, 437, 1973

51 Curling, J. M.
Albumin by ionexchange
in: Curling, J. M. (Ed.), Methods of plasma protein fractionation
Academic Press, New York, 1980, pp 80

LEBENSLAUF

Am 05.03.1952 kam ich als Sohn des Drehers Kurt Gonschior und seiner Ehefrau Anita Gonschior, geb. Henow, in Berlin zur Welt.

Im April 1958 wurde ich in die 23. Grundschule in Berlin-Neukölln eingeschult. Im Jahre 1960 zog unsere Familie nach Büderich bei Düsseldorf (heute 4005 Meerbusch 1), wo ich weiter die Evgl. Volksschule besuchte. April 1963 erfolgte ein Schulwechsel zur Städt. Realschule Neuß für Jungen. 1968 schloß ich den Schulbesuch mit Mittlerer Reife ab.

Am 01.08.1968 begann ich eine Berufsausbildung zum Chemielaboranten bei den Farbenfabriken Bayer AG in Dormagen, die am 30.07.1971 mit Bestehen der Prüfung vor der Industrie- und Handelskammer abgeschlossen wurde. Bis zum 30.07.1972 war ich dann als Laborant im Organisch-wissenschaftlichen Labor meiner Lehrfirma tätig.

Seit dem 01.08.1972 besuchte ich das Erzbischhöfliche Friedrich-Spee-Kolleg in Neuß - Institut zur Erlangung der Hochschulreife; am 19.12.1974 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1975 nahm ich an der Universität Düsseldorf das Medizinstudium auf. Am 25.03.1977 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab. Durch eine Erkrankung war ich vom Wintersemester 1978/79 bis zum Wintersemester 1979/80 zu einer Unterbrechnung des Studiums gezwungen. Am 20.03.1980 bestand ich den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung. Im Sommersemester 1980 setzte ich mein Studium fort und legte am 19.03.1982 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung ab. Zur Zeit bin ich im Rahmen des Praktischen Jahres in den Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf tätig. Das Studium wird voraussichtlich im Frühjahr 1983 abgeschlossen werden.

Düsseldorf, den 15.01.1983 Bernd Gonschior

Bernd Gonschior